Aus dem Institut für Medizinische Strahlenkunde

Direktor: Professor Dr.rer.nat. A.M. Kellerer

AUTORADIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN MIT ^{3}H-THYMIDIN ZUR BESTIMMUNG VON ZELLZYKLUSPARAMETERN MIT HILFE DER PROZENT-MARKIERTE-MITOSEN-METHODE BEI GLIA- UND ENDOTHELZELLEN IM GEHIRN DER 14 TAGE ALTEN RATTE

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Barbara Wittmann

aus Neustadt/Aisch

Würzburg, den 12. Juni 1980

Aus dem Institut für Medizinische Strahlenkunde

Direktor: Professor Dr.rer.nat. A.M. Kellerer

AUTORADIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN MIT ^{3}H-THYMIDIN ZUR BESTIMMUNG VON ZELLZYKLUSPARAMETERN MIT HILFE DER PROZENT-MARKIERTE-MITOSEN-METHODE BEI GLIA- UND ENDOTHELZELLEN IM GEHIRN DER 14 TAGE ALTEN RATTE

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Barbara Wittmann

aus Neustadt/Aisch

Würzburg, den 12. Juni 1980

Referent: Professor Dr.med. B. Maurer-Schultze

Korreferent: Professor Dr.med. H.-W. Altmann

Dekan: Professor Dr.med. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 28.7.1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

Meinen Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543520_0047

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. EINLEITUNG 1

II. MATERIAL UND METHODEN 5

1. Versuchstiere 5

2. Verwendete radioaktive Substanz 5

3. Durchführung der Tierversuche 5

4. Herstellung der histologischen Schnitte 7

4.1. Gehirn 7

4.1.1. Einbetten der Gehirne 7

4.1.2. Herstellung der Schnitte 7

4.1.3. Färbung der Gehirnschnitte 7

4.2. Dünndarm 8

5. Herstellung der Autoradiogramme 8

6. Auswertung der Autoradiogramme 9

6.1. Kriterien zur Identifizierung von Glia- und Endothelzellen 9

6.2. Kriterien zur Identifizierung von Mitosen 11

6.3. Auswertungskriterien für markierte Zellen 12

6.4. Bestimmung von Kernanschnittsflächen markierter Zellen 13

III. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE 14

1. Bestimmung von Zellzyklusparametern aus dem Verlauf der Prozent-markierte-Mitosen-Kurve für Glia- und Endothelzellen 14

1.1. Aufstellung der PLM-Kurve 14

1.2. Herleitung von Zellzyklusparametern 19

2. Bestimmung der Verfügbarkeitszeit von ^{3}H-TdR in Glia- und Endothelzellen 20

3. Bestimmung der mittleren Kornzahl pro Flächeneinheit für Interphasen sowie für Mitosen von Glia- und Endothelzellen als Funktion der Zeit nach Injektion von ^{3}H-TdR 28

Seit

3.1. Interphasen 28

3.2. Mitosen 36

4. Bestimmung der mittleren Kornzahl pro Flächeneinheit für markierte Interphasen von Kryptenepithelzellen des Jejunums 36

IV. DISKUSSION 40

1. Zur Wahl unterschiedlicher autoradiographischer Belichtungszeiten bei der Aufstellung der PLM-Kurve für Glia- und Endothelzellen 40

2. Vergleich der aus der PLM-Kurve abgeleiteten Zellzyklusparameter mit Literaturangaben 41

2.1. Vergleich mit Zellzyklusparametern für Glia- und Endothelzellen der 14 Tage alten Ratte, die mit Hilfe anderer Methoden erhalten wurden 41

2.2. Vergleich mit Zellzyklusparametern für verschiedene Zelltypen des Gehirns während der prä- und postnatalen Ontogenese 42

3. Einfluß der Verfügbarkeitszeit von ^{3}H-TdR auf die Bestimmung von Zellzyklusparametern 44

4. Vorliegen einer Blut-Hirn-Schranke gegenüber TdR bei Glia- und Endothelzellen im Gehirn der 14 Tage alten Ratte 48

5. Markierung proliferierender Glia- und Endothelzellen durch Wiederverwendung ^{3}H-markierter DNA-Metabolite 50

5.1. Hinweise für das Vorliegen einer Markierung durch Wiederverwendung 50

5.2. Auswirkung der Markierung durch Wiederverwendung auf die Bestimmung von Zellzyklusparametern 53

V. ZUSAMMENFASSUNG 57

LITERATURVERZEICHNIS I - I

I. EINLEITUNG

Die Beobachtung von Glia-Mitosen im Gehirn adulter Nager galt lange Zeit als eine Besonderheit. Ihr seltenes Auftreten gab bis etwa 1968 immer wieder Anlaß zu der Vermutung, Gliazellen würden sich amitotisch teilen. Es waren keine Versuche unternommen worden, das Problem des Teilungsmodus von Gliazellen bei jungen Tieren zu untersuchen, obwohl bekannt war, daß im Gehirn eines jungen Tieres mehr Gliazellen mit radioaktiv markiertem Thymidin (TdR) zu markieren sind als beim adulten Tier (Smart und Leblond, 1961; Mares und Lodin, 1972). Die Diskussion, ob bei Gliazellen tatsächlich eine Amitose vorkommt, wurde erst 1967 bzw. 1969 entschieden: Fleischhauer (1967) und Cavanagh und Lewis (1969) konnten aus einem Vergleich von immersionsfixierten (der für lichtmikroskopische Untersuchungen damals üblichen Fixierungsart) und perfusionsfixierten Gehirnen zeigen, daß nur bei einer schnell wirksamen Fixation - wie sie im Falle der Perfusionsfixation über die Blutbahn erfolgt - stets Gliamitosen zu beobachten sind. Bei einer Immersionsfixation ist die Zeitspanne von der Tötung bis zum vollständigen Durchdringen des Gehirns mit der Fixationsflüssigkeit groß genug, daß begonnene Mitosen noch abgeschlossen, aber keine neuen Mitosen mehr eingeleitet werden, folglich also meist keine Mitosefiguren mehr vorhanden sind.

Obwohl Glia-Mitosen im Gehirn junger Tiere (wie z.B. im Gehirn der 14 Tage alten Ratte; vgl. dazu Korr, 1978) mit der Einführung der Perfusionsfixation in reproduzierbarer, wenn auch kleiner Anzahl aufzufinden sind, wurden zellkinetische Untersuchungen mit der üblichen Methode, d.h. der Prozent-markierte-Mitosen-Methode (PLM-Methode; Quastler und Sherman, 1959), die sich allein auf das Registrieren von Mitosefiguren stützt, bisher nicht durchgeführt. Zwar liegen bereits Zellzyklusbestimmungen für Glia- und Endothelzellen im Gehirn der 14 Tage alten Ratte vor, sie wurden jedoch mit Methoden erhalten, die sich auf das Erfassen von markierten Interphasezellen stützen: So ermittelte Schilling (1978) die Dauer von S-Phase

und Zellzyklus mit Hilfe von Doppelmarkierungsmethoden mit ^{3}H- und ^{14}C-TdR. Dauenhauer (1980) bestimmte die Dauer des Zellzyklus aus der Abnahme der mittleren Kornzahl pro Kern markierter Interphasen als Funktion der Zeit nach einer Injektion von ^{3}H-TdR ("grain-count halving method").

Wenn damit auch bereits Werte für die Zellzyklusparameter von Gliazellen vorliegen, schien es dennoch von Interesse zu sein, diese Resultate - die zum Teil mit neu entwickelten Methoden gewonnen worden waren - einmal mit der klassischen zellkinetischen Methode, der PLM-Methode, zu überprüfen. Dabei bot es sich an, die Untersuchungen in bezug auf das Tieralter, den Rattenstamm sowie auf die auszuwertenden Hirnareale genauso durchzuführen wie bei Schilling (1978) und Dauenhauer (1980).

Auf Grund der Auswertungen von ca. 6 400 Mitosen von Glia- und Endothelzellen in Cortex und Corpus callosum der 14 Tage alten Ratte für das Zeitintervall 1 h - 44 h nach Injektion von ^{3}H-TdR ließ sich eine Kurve über den Prozentsatz markierter Mitosen als Funktion der Zeit nach einmaliger Injektion von ^{3}H-TdR aufstellen (PLM-Kurve). Die aus dieser PLM-Kurve abgeleitete Zykluszeit war jedoch derart kurz, daß sie mit allen anderen Daten - sowohl für Glia- und Endothelzellen im Gehirn gleichaltriger Tiere als auch für andere Zellarten im Gehirn junger und adulter Nager - in Widerspruch stand. Damit ergab sich als weiteres Anliegen dieser Arbeit, die aufgetretenen Widersprüche zu klären.

Dazu wurden zwei generelle Voraussetzungen für die Anwendbarkeit der PLM-Methode experimentell überprüft:

1) Inwieweit trifft die Annahme zu, daß - wie bei Körperzellen - auch bei Zellen des Gehirns eine Injektion von ^{3}H-TdR zu einer Pulsmarkierung führt. Nur im Falle einer Pulsmarkierung ist zu erwarten, daß mit der PLM-Methode die Dauer der Zyklusphasen richtig gemessen wird. Außerdem ist bei einer Nicht-Pulsmarkierung, d.h. wenn über eine längere Zeitspanne von z.B. mehreren Stunden noch initial injiziertes ^{3}H-TdR in die S-Phase eingetretene Zellen zu markieren vermag, zu erwarten, daß der Durchgang der markierten Zellen durch aufein-

anderfolgende Mitosen nicht mehr sicher zu bestimmen ist.

Zur Klärung dieser Frage wurde die Verfügbarkeitszeit des injizierten ^{3}H-TdR gemessen, d.h. diejenige Zeitspanne, in der nach einer ^{3}H-TdR Injektion in der Zelle fixierbare ^{3}H-DNA gebildet wird. Diese Zeitspanne wurde mit ca. 60 min bestimmt. Es ließ sich zeigen, daß damit die aufgetretene Diskrepanz nicht zu erklären ist.

2) Weiterhin wurde überprüft, ob zu den verschiedenen Versuchszeiten tatsächlich nur die durch die initiale ^{3}H-TdR Injektion zu Versuchsbeginn markierten Zellen untersucht wurden. Ein Einbeziehen von Zellen, die zu einem späteren Zeitpunkt markiert wurden, in die Untersuchung würde das Messen von Zellzyklusparametern aus einer PLM-Kurve unmöglich machen.

Eine spätere Markierung ist theoretisch durchaus vorstellbar auf Grund einer Wiederverwendung von ^{3}H-DNA Metaboliten aus abgestorbenen Zellen. Eine derartige Markierung, d.h. eine Wiederverwendung von ^{3}H-TdR, ist z.B. von der regenerierenden Leber bekannt (Stöcker und Pfeifer, 1967; Schultze et al., 1973). Für Zellen des Gehirns schien jedoch eine Markierung durch Wiederverwendung nicht in Frage zu kommen: Hier existiert eine Blut-Hirn-Schranke (BHS) gegenüber TdR (Schultze et al., 1972; Knorre, 1979), d.h. es ist zur Markierung einer proliferierenden Zelle im Gehirn im Vergleich zur Markierung einer Körperzelle ca. 10 mal mehr ^{3}H-TdR notwendig. Eine geringe Aktivitätsmenge (wie sie im Falle der Wiederverwendung vorliegt) dürfte also im Gehirn nicht zu einer nachweisbaren Markierung führen.

Wenn auch der experimentelle Nachweis einer BHS gegenüber TdR bisher nur an adulten Mäusen durchgeführt worden war, und es nahelag, daß bei der jungen Ratte dieser Faktor ähnlich groß ist, wurden dennoch zunächst einmal die Verhältnisse hinsichtlich der BHS bei der 14 Tage alten Ratte untersucht. Ein Vergleich der Markierung von Zellen des Gehirns mit derjenigen von Körperzellen, d.h. der mittleren Kornzahl pro Flächeneinheit von Gliazellen zu den entsprechenden Werten von Kryptenepithelzellen des Jejunums, ergab ein überraschendes

Resultat: Bei der 14 Tage alten Ratte war die Korndichte der Kryptenepithelzellen nur wenig höher als diejenige der Gliazellen. Damit hatte sich die ursprüngliche Annahme einer BHS gegenüber TdR als falsch erwiesen. Als Folge davon war also tatsächlich in Erwägung zu ziehen, daß eine auf Wiederverwendung von ^{3}H-DNA-Metaboliten beruhende Markierung die ermittelte PLM-Kurve beeinflußt hatte.

Durch eine genaue Analyse der Kornzahl pro Flächeneinheit von markierten Glia-Interphasezellen konnte nachgewiesen werden, daß die markierten Zellen im Zeitintervall zwischen 8 h und 28 h nach Injektion von ^{3}H-TdR in zwei unterschiedlich stark markierte Gruppen zerfallen: Einmal in eine Gruppe mit stark markierten Zellen und zum andern in eine Gruppe, bei der die Zellkerne nur sehr schwach markiert sind. Es ließ sich zeigen, daß die Gruppe mit den stark markierten Zellen denjenigen Gliazellen zuzuordnen ist, die zu Versuchsbeginn durch die ^{3}H-TdR Injektion markiert worden sind. Die andere Gruppe mit den sehr schwach markierten Zellen ist erst einige Stunden nach der initialen ^{3}H-TdR Injektion markiert worden. Es ergaben sich hier einige Übereinstimmungen zu Zellgruppen, die in der Literatur als durch Wiederverwendung markiert angesehen werden. Damit wurde insgesamt verständlich, daß die Zykluszeit, die hier aus einer PLM-Kurve abgeleitet wurde, falsch war. Eine Korrektur der PLM-Kurve für die durch Wiederverwendung markierten Zellen, d.h. ein Bezug allein auf initial markierte Glia- und Endothelzellen erwies sich in dieser Arbeit als nicht durchführbar.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. VERSUCHSTIERE

Die Versuche wurden an insgesamt 64 jungen Albinoratten vom Inzuchtstamm Wistar durchgeführt. Die Versuchstiere entstammten einer eigenen Nachzüchtung aus Tieren des Zentralinstituts für Versuchstierzucht in Hannover-Linden und waren zu Versuchsbeginn 14 Tage alt. Diese Tiere wogen zwischen 17 g - 36 g; der Mittelwert betrug 28,3 g ± 0,5 g (Standardfehler des Mittelwerts). Das Geschlechtsverhältnis der Versuchstiere war 30 ♂: 34 ♀. Die Umweltbedingungen bei der Haltung der Versuchstiere wurden wie folgt festgelegt: Raumtemperatur 24 °C, automatischer Licht - Dunkel - Wechsel (Licht von 6 - 16 Uhr), Zuchtdiät Altromin R - 1310, Wasser ad libitum, Verbleiben aller Versuchstiere bei der Mutter im Makrolon-Käfig bis zu Versuchsende. Jeder Wurf war auf 6 Jungtiere am Tag nach der Geburt reduziert worden.

2. VERWENDETE RADIOAKTIVE SUBSTANZ

Zur Markierung der DNA wurde Thymidin-Methyl-^{3}H (^{3}H-TdR) benutzt. Die spezifische Aktivität betrug hierbei 6 700 mCi/mmol. Geliefert wurde das ^{3}H-TdR von der Firma New England Nuclear Chemicals, Boston/Mass., USA. Es wurde nur ^{3}H-TdR verwendet, das nach der Lieferung nicht länger als 6 Wochen im Kühlschrank (4 °C) aufbewahrt worden war.

3. DURCHFÜHRUNG DER TIERVERSUCHE

Nach dem Wiegen und der individuellen Kennzeichnung mit einem Farbstift (Edding 3000) erhielten die Versuchstiere ohne vorherige Narkose intraperitoneal eine einmalige Injektion von

10 µCi ^{3}H-TdR pro g Körpergewicht. Diese Injektion erfolgte am Vormittag zwischen 8 und 11 Uhr. Für die Versuchszeiten t = 18 h und t = 20 h wurden jeweils drei Versuchstiere am Vormittag und zusätzlich drei Tiere gegen 18 Uhr injiziert (Tiere Nr. 4046, 4047, 4048 für t = 18 h und Tiere Nr. 4062, 4063 und 4775 für t = 20 h nach Injektion von ^{3}H-TdR). Nach der Injektion kamen die Jungtiere sofort wieder in den Käfig zu Mutter und Geschwistern zurück. 1, 2, 4, 5, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 26, 28, 30, 32, 36, 40 und 44 h nach der einmaligen ^{3}H-TdR Injektion wurden je 3 - 6 Jungtiere in der folgenden Weise getötet:

5 Minuten vor dem geplanten Zeitpunkt der Tötung erhielten die Tiere zur Narkose jeweils eine intraperitoneale Injektion von 0,005 ml pro g Körpergewicht wäßriger Chloralhydratlösung (10 %ige Lösung). Ca. 3 - 4 Minuten später wurde jedes Tier in Rückenlage auf einem Tablett an den vier Extremitäten fixiert. Nach Erlöschen des Cornealreflexes erfolgte die Eröffnung von Abdomen und Thorax mit Freilegung des Herzens. Die Vena cava inferior wurde durchtrennt und eine an der Spitze hakenförmig gebogene Kanüle, die mit Hilfe eines Silikonschlauches mit einer Record-Spritze verbunden war, in die linke Herzkammer eingelegt.

Nun wurden mit der Spritze folgende Lösungen langsam über eine Zeitspanne von ca. 5 Minuten in die Blutbahn infundiert:
1.) 20 ml Formalin (1 + 9, pH 7,2) 2.) 30 ml Formalingemisch (99 Teile Formalin (1 + 4) und 1 Teil 96 %ige Essigsäure), 3.) 20 ml Formalin (1 + 4, pH 7,2). Das Formalin war jeweils kurz vor Beginn des Versuchs frisch aus Paraformaldehyd angesetzt worden.

Nach Beendigung der Perfusion wurde das Gehirn freipräpariert, Hirnhäute sowie Bulbus olfactorius und Cerebellum abgetrennt und das Gehirn in eine Formalinlösung (1 + 4, pH 7,2) unter Zusatz von 0,1 mg inaktivem TdR pro ml eingelegt. In dieser Lösung verblieb das Gehirn bei 4 °C für 5 - 8 Tage im Kühlschrank wobei das Fixationsgemisch zweimal erneuert wurde.

Bei einigen Versuchstieren wurde zusätzlich zum Gehirn ein Stück vom Jejunum ca. 6 cm unterhalb des Pylorus entnommen.

Die weitere Behandlung der Dünndarmstückchen erfolgte in gleicher Weise wie beim Gehirn.

4. HERSTELLUNG DER HISTOLOGISCHEN SCHNITTE

4.1. Gehirn

4.1.1. Einbetten der Gehirne

Nach Beendigung der Fixation wurden die Gehirne über Nacht in fließendem Leitungswasser gewässert. Anschließend wurden sie in einer aufsteigenden Äthylalkoholreihe dehydriert. Dabei blieben die Gehirne für jeweils zwei Stunden in 70 %igem, 96 %igem und absolutem Alkohol. Darauf wurden sie für eine Stunde in ein Gemisch (1 : 1) von Aceton und absolutem Alkohol gebracht, für zweimal eine halbe Stunde in reines Aceton, dann für zweimal 3 Stunden in flüssiges Paraplast^{R} (62 °C). Anschließend wurden sie in Metallrahmen in Paraplast^{R} ausgegossen, so daß ein kubischer Gehirn-Paraplast^{R} - Block entstand.

4.1.2. Herstellung der Schnitte

Mit Hilfe eines Leitz-Grundschlitten-Mikrotoms wurden 3 µm dicke Transversalschnitte in Serie hergestellt, und zwar aus demjenigen Vorderhirnbereich, der durch die Schnittebenen Corpus callosum / Commissura anterior und Corpus callosum / Commissura fornicis ventralis begrenzt ist. Die Schnitte wurden mit Hilfe von Streckwasser (10 ml Aceton, 40 ml Aqua dest., 0,5 ml Eiweißglycerin) auf Objektträger aufgezogen.

4.1.3. Färbung der Gehirnschnitte

Die Schnitte wurden zunächst entparaffiniert und anschließend durch eine absteigende Äthylalkoholreihe hydriert. Dabei betrug die Verweildauer jeweils dreimal 10 Minuten in Xylol, absolutem Äthanol, 96 %igem und 70 %igem Äthanol. Nach dem Spülen mit Aqua dest. wurden die aufgezogenen Schnitte 6 Minuten

lang bei 60 °C in 1 n HCl hydrolysiert. Nach erneutem Eintauchen in Aqua dest. kamen die Schnitte für zwei Stunden in Schiffsches Reagenz (0,5 g Pararosanilin, 70 ml Aqua bidest., 10 ml 1n HCl, 0,5 g Kalium-bisulfit) und wurden dann dreimal zwei Minuten lang in Leitungswasser getaucht und anschließend mit Aqua dest. abgespült (vgl. dazu Lang und Maurer, 1965). Dann wurden die Präparate staubfrei bis zur Verarbeitung zu Autoradiogrammen gelagert.

4.2. Dünndarm

Die Dünndarmstückchen wurden in der gleichen Weise, wie oben für das Gehirn beschrieben, zu Feulgen-gefärbten Schnitten verarbeitet. Die Schnittrichtung erfolgte hier quer zur Längsrichtung der Krypten.

5. HERSTELLUNG DER AUTORADIOGRAMME

Die Autoradiogramme wurden nach der Dipping-Methode mit Ilford K-2-Emulsion (Fa. Ilford Ltd., Essex/England) in folgender Weise bei Rotlicht (Kodak-Wrattenfilter Nr. 1) angefertigt (vgl. Schultze, 1968):
Die gelförmige Emulsion wurde zunächst bei 42 °C im Wasserbad zum Schmelzen gebracht, anschließend mit Aqua bidest. im Verhältnis 2 : 1 verdünnt und vorsichtig durch eine doppelte Mullage filtriert. Die vorgewärmten Objektträger wurden langsam in die 42 °C warme Emulsion eingetaucht und langsam wieder herausgezogen. Gemessen im trockenen Zustand vor dem Entwickeln entstand so eine Schichtdicke von 1 - 2 µm. Die Präparate wurden bei völliger Dunkelheit staubgeschützt und aufrechtstehend getrocknet und dann zusammen mit Trocknungsmittel (Indicating Drierite®) lichtdicht in schwarze Kunststoffkästchen verpackt. Die Exposition (8 - 60 Tage) erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C. Nach Beendigung der Exposition wurden die Kästchen zunächst zum Temperaturausgleich für ca. 60 Minuten ungeöffnet bei Zimmertemperatur belassen, anschließend bei völliger Dunkelheit in frisch angesetztem Amidolentwickler (1,35 g Amidol, 5,4 g Na_2

SO_3 p.a. wasserfrei, 2,4 ml KBr 10 %ig, Aqua bidest. ad 300 ml) 4 Minuten lang bei 18 °C entwickelt. Dann erfolgte die Fixation mit 30 %iger Natriumthiosulfatlösung für die Dauer von 10 Minuten. Nun wurden die Autoradiogramme etwa 20 Minuten lang in fließendem Leitungswasser belassen, darauf kurz in Aqua bidest. gespült, anschließend unter Vermeidung von Verstauben luftgetrocknet und dann mit einem Deckglas unter Zuhilfenahme von Entellan^R (Fa. Merck, Darmstadt) eingedeckt.

6. AUSWERTUNG DER AUTORADIOGRAMME

Alle Präparate wurden unter Ölimmersion bei einer 1000-fachen Vergrößerung und unter Zuhilfenahme eines Okularzählnetzes (20 x 20 Zählquadrate mit einer Kantenlänge von 4.1 µm pro Zählquadrat) im Hinblick auf markierte Interphasen sowie markierte und unmarkierte Mitosen ausgewertet (Ortholux, Fa. Leitz/Wetzlar). Dabei wurde darauf geachtet, daß die untersuchten Schnitte einen Abstand von mindestens 15 µm aufwiesen. Damit sollte sichergestellt werden, daß eine markierte Zelle in aufeinanderfolgenden Serienschnitten nicht mehrfach ausgewertet wurde.

Abb. 1 gibt einen Überblick der untersuchten Hirnareale: Ausgehend von der Fissura longitudinalis wurde jeweils in der rechten wie auch der linken Cortexhälfte eine Fläche von ca. 2 000 - 2 500 µm Breite (ca. 25 - 30 nebeneinanderliegende Zählnetze) systematisch untersucht (waagerecht schraffierte Fläche in Abb. 1). Ein Areal von der gleichen Breite wurde auch vom Corpus callosum untersucht, wobei jedoch die subependymale Schicht ausgespart blieb (Fläche mit Schrägkreuzen in Abb. 1).

6.1. Kriterien zur Identifizierung von Glia- und Endothelzellen

Im untersuchten Vorderhirnbereich der jungen Ratte sind folgende Zellarten vorhanden: Nervenzellen - Gliazellen (Astrocyten, Oligodendrocyten, Mikrogliazellen) - Zellen der subependymalen Schicht - Ependymzellen - Zellen des Plexus chorioideus - Endo-

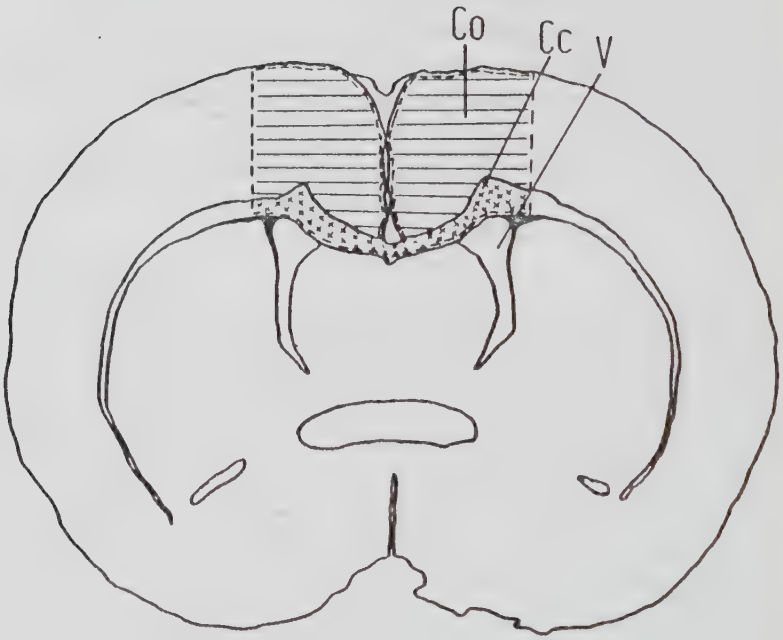

Abb. 1: Schema der untersuchten Areale im Gehirn der 14 Tage alten Ratte

Abkürzungen: Co - Cortex
Cc - Corpus callosum
V - Ventriculus lateralis

thelzellen und Pericyten in Verbindung mit Blutgefäßen - Zellen der Hirnhäute - evtl. eingewanderte Zellen hämatogener Herkunft wie Makrophagen und Monocyten. In der vorliegenden Untersuchung ging es besonders um Glia- und Endothelzellen. Diese beiden Zellarten ließen sich deutlich von den aufgeführten anderen Zelltypen auf Grund der Kernmorphologie (siehe dazu Penfield, 1932; Smart und Leblond, 1961; Mori und Leblond, 1969a,b; 1970; Ling et al., 1973; Kraus-Ruppert et al., 1975) und im Falle der Endothelzellen zusätzlich wegen ihrer unmittelbaren Nachbarschaft zu Blutgefäßen erkennen. Eine Unterteilung der Gliazellen in die einzelnen Zelltypen war allerdings nicht möglich. Unter der Bezeichnung "Gliazellen" werden in dieser Arbeit Astrozyten, Oligodendrocyten und Mikrogliazellen zusammengefaßt. Desgleichen konnten Endothelzellen und Pericyten nicht unterschieden werden. Der Begriff "Endothelzellen" umfaßt also hier diese beiden Zellarten.

6.2. Kriterien zur Identifizierung von Mitosen

Für die vorliegende Arbeit wurden Zellen von etwa der mittleren Prophase bis zur späten Anaphase bzw. Telophase als Mitosen gewertet. Dabei wurde ein Zellkern nur dann als in der Prophase befindlich angesehen, wenn mehr als die Hälfte der Kernmembran aufgelöst und die Kondensation des Chromatins deutlich erkennbar war. Im Falle der Telophasen wurden nur solche Teilungsfiguren noch als Mitose bezeichnet, bei denen der räumliche Zusammenhang der Tochterzellen noch erkennbar war und außerdem noch keine vollständigen Kernmembranen ausgebildet waren.

Eine Identifizierung einer Mitose als Endothelzellmitose war nur in denjenigen Fällen möglich, bei denen auf Grund des Anschnitts des zugehörigen Blutgefäßes deutlich zu sehen war, daß die Mitose in der Gefäßwand lag. Diese Voraussetzung trifft sicherlich nur für einen Teil der vorhandenen Mitosen von Endothelzellen zu. Es wurde deshalb bei der Auswertung der vorliegenden Untersuchung darauf verzichtet, eine Unterscheidung zwischen Glia- und Endothel-Mitosen vorzunehmen.

6.3. Auswertungskriterien für markierte Zellen

Von den Silberkörnern, die durch die ß-Strahlung des in den Zellkern eingebauten ^{3}H-TdR hervorgerufen wurden, sind außerdem Silberkörner zu unterscheiden, die unspezifisch entstanden sind. Diese unspezifischen Silberkörner werden in ihrer Gesamtheit als Nulleffekt bezeichnet. Die Entstehung des Nulleffekts hat verschiedene Ursachen: Er ist zum Teil schon im angelieferten Emulsionsgel vorhanden und wurde z.B. durch Einwirken kosmischer Strahlung beim Transport verursacht. Zum andern entsteht er bei der Herstellung der Autoradiogramme, z.B. durch das Rotlicht in der Dunkelkammer, auf Grund mechanischer Beanspruchung der Photoschicht bei der Verarbeitung oder durch Lagerung bei zu hohen Temperaturen während der Expositionszeit etc. (siehe dazu Schultze, 1968; Amlacher, 1974). Zur Unterscheidung einer schwach markierten Zelle von einer unmarkierten Zelle mit Silberkörnern, die vom Nulleffekt hervorgerufen wurden, werden prinzipiell zwei Verfahren angewendet:

1.) Man ermittelt auf den Autoradiogrammen zunächst die Kornverteilung aller Zellen und stellt Histogramme über die Häufigkeitsdichte der Kornzahl pro Kern auf. Dabei werden auch alle Zellen ohne Silberkörner registriert. Üblicherweise erhält man Histogramme mit einem zweigipfeligen Kurvenverlauf: Der erste Teil der Kurve (meistens mit einem Maximum bei 0 Körnern pro Kern) wird dem Nulleffekt zugeordnet; der zweite, meist recht breite Kurventeil, den markierten Zellen. Bei diesem Verfahren wählt man als untere Zählgrenze diejenige Kornzahl pro Kern, bei der die Häufigkeitsverteilungskurve ihr Minimum hat.

2.) Man bestimmt auf Autoradiogrammen unmarkierter Schnitte die mittlere Kornzahl pro Kern. Dabei sollten die Schnitte vergleichbare histologische Strukturen aufweisen. Außerdem muß gewährleistet sein, daß unmarkierte und markierte Schnitte unter völlig identischen Bedingungen zu Autoradiogrammen verarbeitet wurden. Von diesem strengen Verfahren sieht man jedoch in den meisten Fällen ab und bestimmt die mittlere Kornzahl pro Kern über unmarkierten Arealen des markierten

Schnittes. Bei dieser Methode ergab sich für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Autoradiogramme ein Nulleffekt zwischen 0,1 und maximal 0,4 Körnern pro Flächeneinheit (siehe dazu Abschnitt 6.4.), wobei es innerhalb eines Schnittes durchaus Schwankungen gab. Bei den stets unmarkierten Neuronen wurden auf einer Kernfläche, die im Mittel derjenigen einer Gliazelle entspricht, höchstens 2 Silberkörner beobachtet. Deshalb wurde bei der Auswertung eine Interphasezelle (Glia- oder Endothelzelle) stets dann als markiert gewertet, wenn sie 3 oder mehr Körner pro Kern aufwies. Bei den Endothelzellen kam es bei englumigen Kapillaren manchmal vor, daß zwei kleine Kernanschnitte vorhanden waren. Da hier offensichtlich ein Kern zweimal angeschnitten war, wurden in diesen Fällen beide Anschnitte als ein Endothelzellkern gewertet.

Im Falle der Mitosen wurde zu jeder aufgefundenen Mitose die zugehörige Kornzahl notiert (0 - 9, ≥ 10 Körner pro Mitose).

6.4. Bestimmung von Kernanschnittsflächen markierter Zellen

Die Kernanschnittsfläche markierter Zellen wurde unter Zuhilfenahme eines Okularzählnetzes wie folgt abgeschätzt: Die interessierenden Zellkerne wurden jeweils so ins Blickfeld gebracht, daß sich ihre Fläche gut mit der Fläche eines Zählquadrates des Okularzählnetzes (Kantenlänge des dazu benutzten Zählnetzes: 5,7 µm) vergleichen ließ. Die Abschätzung der Kernanschnittsfläche erfolgte in Stufen von 0,1 Zählquadraten. Registriert wurden damit relative Kernanschnittsflächen, d.h. die in den folgenden Tabellen angegebenen Flächenwerte beziehen sich auf eine Einheitsfläche von $(5{,}7\ \mu m)^2 = 32{,}49\ \mu m^2$.

III. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

1. BESTIMMUNG VON ZELLZYKLUSPARAMETERN AUS DEM VERLAUF DER PROZENT-MARKIERTE-MITOSEN-KURVE FÜR GLIA- UND ENDOTHELZELLEN

1.1. Aufstellung der PLM-Kurve

Insgesamt 64 junge Ratten erhielten eine einmalige Injektion von ^{3}H-TdR und wurden danach zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 1 h und 44 h getötet. Auf meist vier Autoradiogrammen pro Versuchstier wurde die Kornzahl pro Kern (0 - 9, ≥ 10) von jeweils ca. 100 Mitosen von Glia- und Endothelzellen bestimmt. Eine Zusammenstellung dieser Meßwerte enthält Tabelle 1. Unter der Annahme, daß eine Mitose ebenso wie eine Interphasenzelle mit ≥ 3 Körnern pro Kern markiert ist (vgl. Kap. II, 6.3.), wurde für jedes Versuchstier der Prozentsatz markierter Mitosen berechnet (Tab. 1, Spalte VII). Wie die Tabelle zeigt, stimmen die Einzelwerte pro Versuchszeitraum untereinander meist recht gut überein. Hervorzuheben ist diese Übereinstimmung für die Versuchszeiten 18 h und 20 h nach Injektion von ^{3}H-TdR: Hierbei waren jeweils 3 Tiere (18 h: VT 4046, 4047, 4048; 20 h: VT 4762, 4763, 4775) am Nachmittag zwischen 16 und 18 Uhr mit ^{3}H-TdR injiziert worden, während alle anderen Versuchstiere derselben Versuchszeiten das markierte TdR am Morgen zwischen 8 und 9 Uhr erhalten hatten. Offensichtlich hat also für diese Versuchszeiten die Tageszeit der Injektion keinen Einfluß auf den Prozentsatz markierter Mitosen.

In Abb. 2 sind die Werte aus Tab. 1, Spalte VII als Funktion der Versuchszeit aufgetragen. Man erhält damit eine sog. PLM-Kurve (vgl. Quastler und Sherman, 1959). Wie man sieht, steigt die PLM-Kurve nach einer Versuchszeit von $t > 1$ h steil an, erreicht nach ca. 3 h einen Wert von 50 % markierter Mitosen und hat dann etwa zum Zeitpunkt $t = 8$ h nach Injektion von ^{3}H-TdR ihr erstes Maximum mit nahezu 100 % markierter Mitosen erreicht. Bei $t = 14$ h ist ein erstes Minimum erkennbar.

Tabelle 1: Kornzahl pro Kern bei Mitosen von Glia- und Endothelzellen in Cortex und Corpus callosum der 14 Tage alten Ratte als Funktion der Zeit nach Injektion von ^{3}H-TdR

I	II	III	IV	V	VI											VII
Vt.-Nr.	Zeit nach ^{3}H-TdR (h)	Bel.-Zeit (d)	♂/♀	Gew. (g)	Anzahl von Mitosen mit Kornzahl pro Kern											PLM (%)
					0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	≥10	
2841	1	8	♂	30	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100.0
3075	1	3*	♀	34	104	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100.0
3071	1	30**	♂	36	102	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100.0
3184	2	8	♀	29	118	0	0	0	1	0	0	0	1	0	18	14.5
3185	2	8	♀	29	110	0	0	0	0	1	1	3	2	3	21	22.0
4036	2	8	♀	32	153	0	0	3	0	2	1	1	3	2	19	16.9
3188	4	8	♂	29	22	2	7	2	0	3	2	3	8	3	49	69.3
3189	4	8	♂	31	5	6	4	3	4	5	5	8	13	13	35	85.2
3264	4	8	♀	27	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	47	96.0
3071	5	3*	♂	36	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	103	93.6
3075	5	30**	♀	34	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	105	89.0
4039	5	8	♂	33	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	151	95.6
4051	8	14	♂	28	3	1	0	0	2	3	0	6	3	1	77	95.9
4052	8	14	♀	26	0	0	0	0	2	3	4	4	2	2	87	100.0
4041	8	14	♂	32	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	69	98.6
4040	8	8	♂	32	1	0	1	0	0	0	0	1	1	2	94	98.0
3045	10	8	♀	30	4	0	0	1	4	3	2	4	3	2	76	96.0
3049	10	8	♂	32	2	2	4	8	12	13	9	14	10	3	19	91.7
4071	12	14	♀	30	3	7	6	4	3	4	4	3	8	8	52	84.3
4073	12	14	♀	29	4	9	12	1	8	6	2	3	3	1	30	74.8
4070	12	14	♂	30	7	8	7	10	13	5	8	7	7	7	20	78.2

Fortsetzung Tabelle 1

I	II	III	IV	V	VI											VII
Vt.-Nr.	Zeit nach ^{3}H-TdR (h)	Bel.-Zeit (d)	♂/♀	Gew. (g)	Anzahl von Mitosen mit Kornzahl pro Kern											PLM
					0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	≥10	(%)
4053	14	14	♂	27	11	13	15	5	8	7	4	3	0	2	31	60.6
4055	14	14	♂	27	24	3	11	7	6	2	6	0	3	1	36	61.6
4054	14	8	♀	28	14	14	13	5	10	5	8	4	8	5	13	58.6
4758	16	14	♀	23	7	4	10	6	10	10	8	3	2	7	32	78.8
4761	16	14	♂	23	5	2	7	3	3	7	3	6	7	5	53	86.1
4759	16	14	♂	24	60	0	0	5	11	10	15	5	13	6	36	62.7
4046	18	21	♀	28	9	5	7	3	5	4	6	8	4	7	53	81.1
4047	18	21	♀	28	3	3	3	2	7	2	8	4	6	9	48	90.5
4048	18	21	♂	29	3	0	4	2	10	6	9	8	10	7	41	93.0
5252	18	21	♂	28	11	0	2	2	0	12	7	10	12	10	83	92.3
5253	18	21	♂	28	1	0	1	0	4	4	3	3	4	12	71	98.1
5254	18	21	♀	27	3	1	1	1	1	3	2	4	6	2	76	95.0
4763	20	28	♂	23	2	1	3	3	5	8	4	7	6	10	51	94.0
4762	20	28	♀	23	2	0	0	1	1	2	6	4	4	2	93	98.3
4775	20	28	♀	31	3	0	0	0	0	1	9	1	3	5	75	96.9
5255	20	21	♀	27	2	0	2	0	3	3	2	4	3	10	69	95.9
5256	20	21	♀	27	9	0	0	0	1	3	5	5	3	7	117	94.0
5257	20	21	♂	27	0	2	0	0	2	4	3	5	6	3	79	98.1
4064	22	21	♂	33	4	5	4	20	10	14	4	7	5	3	23	86.9
4065	22	21	♀	30	10	9	18	12	13	10	8	4	5	2	19	67.0
4067	22	21	♀	31	3	5	7	19	17	11	11	9	3	1	16	85.3
3966	26	30	♀	22	7	11	9	9	9	5	4	5	4	5	29	72.2
3967	26	21	♀	20	13	7	10	2	1	5	5	0	5	4	48	70.0
3968	26	14+	♂	22	12	7	12	7	10	10	2	2	2	2	35	69.3
3969	26	30	♀	21	30	8	9	6	5	8	5	2	5	3	32	58.4

3970	28	21	♂	19	10	6	15	4	6	10	7	6	4	5	26	68.7
3971	28	30+	♀	17	42	5	23	3	19	1	12	0	10	6	4	44.0
4068	28	30+	♀	32	15	15	29	7	8	7	4	1	6	0	27	50.4
4770	30	14	♀	31	9	10	11	1	5	7	5	9	9	4	28	69.4
4771	30	14	♂	31	7	3	9	2	3	5	8	3	5	9	43	80.4
4773	30	14	♀	30	8	14	16	6	10	8	3	4	7	3	20	61.6
4772	30	28+	♂	33	18	1	4	0	3	2	2	0	4	5	39	76.5
3836	32	30+	♂	28	4	4	19	6	12	8	7	4	12	5	38	77.3
4030	32	30+	♂	28	1	7	26	12	23	9	15	5	7	10	30	76.6
4031	32	30+	♀	28	19	11	31	8	24	6	8	6	6	1	22	57.0
4032	36	30+	♂	29	12	12	15	22	14	15	4	5	6	2	27	70.9
4033	36	30	♂	29	4	3	11	8	10	6	7	5	4	9	32	81.8
4035	36	60+	♀	27	7	7	10	3	9	8	9	6	12	13	62	83.6
4050	40	60+	♂	29	9	9	8	15	17	19	14	7	3	2	12	77.4
4074	40	60+	♀	30	6	4	10	16	19	17	16	9	9	7	18	84.7
4075	40	30+	♀	29	13	11	16	13	17	13	4	7	4	2	23	69.9
3831	44	30+	♂	29	18	17	13	3	11	14	5	4	6	4	28	61.0
3832	44	30+	♀	26	8	11	21	3	19	10	7	3	14	7	44	72.3
3833	44	30+	♀	28	17	16	27	18	32	10	9	3	12	5	11	62.5

Abkürzungen: Vt.-Nr. = Versuchstier-Nummer
Zeit nach Injektion von ^{3}H-TdR in Stunden
Belichtungszeit in Tagen
Gewicht in Gramm

Symbole: - = Die ausgewerteten Autoradiogramme wiesen unterschiedliche Belichtungszeiten auf; sie wurden auf die hier angegebene Belichtungszeit umgerechnet.

*,** = Auswertung von Doppelmarkierungsversuchen, wobei die Versuchstiere 800 µCi ^{3}H-TdR (3 d Exposition) und 10 µCi ^{14}C-TdR (30 d Exposition) erhalten hatten.

*: Bei der Auswertung gelten alle ^{3}H-markierten Zellen (mit und ohne ^{14}C) als markiert, die rein ^{14}C-markierten Zellen jedoch als unmarkiert.

**: Bei der Auswertung gelten alle ^{14}C-markierten Zellen (mit und ohne ^{3}H) als markiert, jedoch die rein ^{3}H-markierten Zellen als unmarkiert.

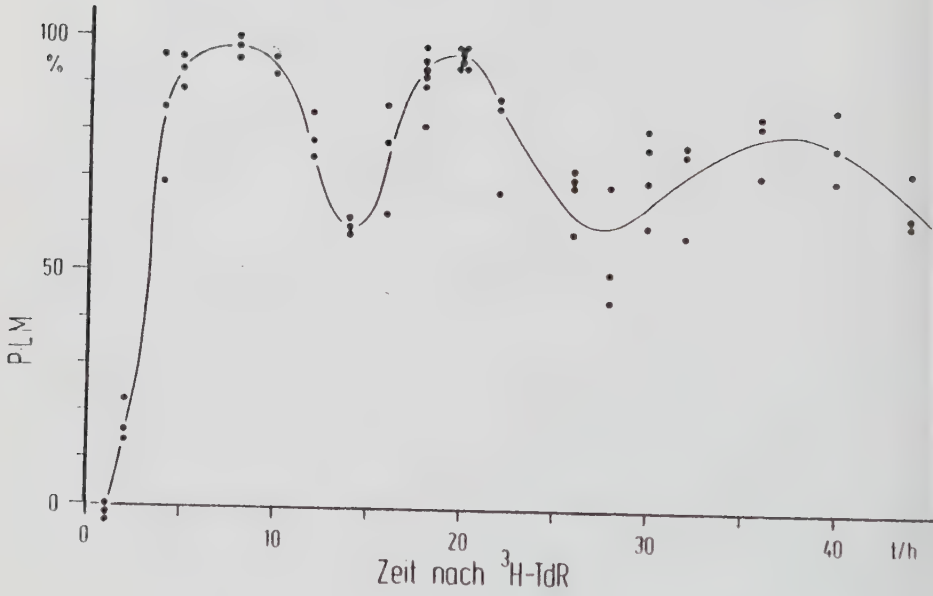

Abb. 2: Prozentsatz-markierter-Mitosen (PLM) für Glia- und Endothelzellen in Cortex und Corpus callosum der 14 Tage alten Ratte als Funktion der Zeit nach Injektion von ^{3}H-TdR

Punkte: Meßwerte für die einzelnen Versuchstiere

Danach steigen die Prozentsätze markierter Mitosen innerhalb weniger Stunden wieder an und erreichen bei ca. t = 20 h ein zweites Maximum. Dieses Maximum liegt ähnlich wie das erste Maximum wiederum nahe bei 100 % markierter Mitosen. Die PLM-Kurve fällt danach wieder ab und durchläuft bei ca. t = 28 h ein zweites Minimum. Etwa zum Zeitpunkt t = 36 h deutet sich ein drittes Maximum an.

1.2. Herleitung von Zellzyklusparametern

Aus dem Verlauf einer PLM-Kurve lassen sich üblicherweise folgende Zellzyklusparameter herleiten (vgl. z.B. Schultze, 1969, Aherne et al., 1977):

a) T_{G_2} + 1/2 M: Diese Zeitspanne ergibt sich aus der Zeitdifferenz zwischen Versuchsbeginn (t = 0 h) und demjenigen Zeitpunkt, an dem die PLM-Kurve zum ersten Mal 50 % erreicht. Im Falle der Glia- und Endothelzellen im Gehirn der jungen Ratte läßt sich T_{G_2} + 1/2 M mit 3 h abschätzen.

b) T_S: die mittlere Dauer der DNA-Synthesephase kann man auf zweierlei Art bestimmen, nämlich erstens aus der Zeitdifferenz zwischen den beiden 50 %-Werten des auf- und absteigenden Schenkels der PLM-Kurve und zweitens aus der Fläche unter dem ersten Maximum der PLM-Kurve (siehe dazu Gerecke, 1970).

Wenn auch in Abb. 1 der absteigende Schenkel der PLM-Kurve nach dem ersten Maximum nicht den 50 %-Wert erreicht, so läßt sich dennoch auf Grund einer Extrapolation die Zeitspanne T_S mit 10 - 11 h abschätzen. Eine genaue Bestimmung von T_S aus der Fläche unter dem ersten Maximum in Abb. 2 war wegen der dafür zu ungenauen Extrapolation der PLM-Kurve auf die Zeitachse nicht möglich.

c) T_C: Die mittlere Dauer der Generationszeit erhält man aus dem Zeitintervall zwischen korrespondierenden Punkten im Maximum der ersten beiden Wellen markierter Mitosen. Im Falle von Abb. 2 ergibt sich danach eine Zeitspanne von 12 - 13 h.

d) T_{G_1}: Die Dauer der G_1-Phase läßt sich zwar nicht direkt aus dem Verlauf der PLM-Kurve herleiten; wenn aber T_C, T_S und T_{G_2} + M bekannt sind, bekommt man T_{G_1} auf Grund der Beziehung:

$$T_C = T_S + T_{G_2+M} + T_{G_1} \text{ , d.h.}$$

$$T_{G_1} = T_C - (T_S + T_{G_2+M}) .$$

Nach den in den Abschnitten a - c) hergeleiteten Werten folgt $T_{G_1} \sim 0$ h, d.h. die präsynthetische Ruhephase G_1 fehlt oder ist nur sehr kurz.

2. BESTIMMUNG DER VERFÜGBARKEITSZEIT VON ^{3}H-TdR IN GLIA- UND ENDOTHELZELLEN

Definitionen: Der Begriff "Verfügbarkeitszeit" wird in der Literatur in zweierlei Hinsicht gebraucht (siehe dazu z.B. Kappeler, 1977):

1.) Zeitspanne, in der das injizierte ^{3}H-TdR noch im Blutplasma nachweisbar ist.

2.) Das Intervall von der Injektion des ^{3}H-TdR bis zu demjenigen Zeitpunkt, an dem das Maximum an fixierbarer markierter DNA erreicht ist. Es ist also hier diejenige Zeitspanne gemeint, in der auf Grund des intrazellulären Gehalts an ^{3}H-TdR und dessen Folgeprodukten noch ^{3}H-TdR synthetisiert wird.

Tierversuche und Ergebnisse: In diesem Kapitel soll die Verfügbarkeitszeit in der unter 2.) definierten Weise bestimmt werden. Dazu erhielten insgesamt 17 junge Ratten eine einmalige Injektion von ^{3}H-TdR. Die Tötung erfolgte 10, 20, 40, 60, 120 oder 180 Minuten später. Auf jeweils einem Autoradiogramm pro Versuchstier wurde in Cortex und Corpus callosum (siehe Abb. 1) die Kornzahl pro Interphasenkern von 100 markierten Glia- und 100 markierten Endothelzellen ermittelt. Für die verschiedenen Versuchszeiten wurden Autoradiogramme mit unterschiedlichen Belichtungszeiten ausgewertet, um Fehler durch zu große und damit nicht mehr analysierbare Kornzahlen pro Kern zu vermeiden. Tab. 2a und 2b geben einen Überblick aller bei diesen Versuchen erhaltenen Meßwerte.

Tabelle 2a: Mittlere Kornzahl pro Interphasekern mark. Glia- und Endothelzellen im Gehirn der 14 Tage alten Ratte als Funktion der Zeit nach Injektivon von ^{3}H-TdR

Es wurden jeweils 100 markierte Interphasen von Glia- und Endothelzellen ausgewertet.

I	II	III	IV	V	VI	VII
Vt.-Nr.	Zeit nach ^{3}H-TdR (min)	Bel.-Zeit (d)	♂/♀	Gew. (g)	mittl. Kornzahl pro Kern Glia	mittl. Kornzahl pro Kern Endothel.
5540	10	7	♂	35	11.0	13.7
5541	10	7	♂	28	8.4	15.0
5542	10	7	♀	25	10.0	18.8
5543	20	3	♀	29	15.1	19.9
5544	20	3	♂	31	19.2	25.9
5545	20	3	♀	29	12.8	17.1
5546	40	2	♂	34	16.7	20.1
5547	40	2	♀	24	18.1	21.1
5548	40	2	♀	29	15.1	26.7
5549	60	1	♀	35	14.3	19.2
5550	60	1	♀	25	13.1	16.1
5551	60	1	♂	32	14.8	16.2
5555	120	1	♀	26	15.7	20.1
5556	120	1	♀	29	16.6	18.8
5557	180	3	♂	29	31.0	29.2
5558	180	3	♀	29	26.4	25.3
5559	180	3	♀	26	26.0	27.8

Abkürzungen: Vt.-Nr. = Versuchstier-Nummer
Belichtungszeit in Tagen
Gewicht in Gramm
mittl. Kornzahl = mittlere Kornzahl
Endothel. = Endothelzellen

Tab. 2b: Kornzahl pro Interphasekern markierter Glia- und Endothelzellen im Gehirn der 14 Tage alten Ratte als Funktion der Zeit nach Injektion von ^{3}H-TdR

Angaben zum Gewicht und Geschlecht der Versuchstiere sowie zur Belichtungszeit der Autoradiogramme siehe Tab. 2a.

Vt.-Nr.	Anzahl markierter Glia- (a) und Endothelzellen (b) pro Kornzahlintervall																	
	3 - 4		5 - 9		10 - 14		15 - 19		20 - 24		25 - 29		30 - 34		35 - 39		40 - 44	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
5540	12	8	42	31	27	22	9	18	3	9	4	5	0	5	1	1	2	0
5541	17	6	50	32	24	19	8	11	0	15	1	8	0	4	0	3	0	2
5542	9	1	46	18	24	15	17	18	4	19	0	13	0	6	0	4	0	4
5543	1	1	23	9	26	23	30	20	12	19	5	11	1	13	1	2	1	1
5544	0	0	12	8	20	12	25	18	21	18	13	10	4	10	4	11	0	2
5545	1	1	36	21	32	28	18	18	7	11	4	12	2	6	0	0	0	1
5546	1	0	19	18	28	21	23	18	13	15	9	13	2	4	3	4	2	2
5547	0	0	11	7	24	23	26	19	19	20	12	7	5	15	2	5	1	2
5548	3	1	22	13	25	20	26	21	13	27	8	11	2	7	1	3	0	1
5549	4	0	28	18	22	21	22	15	17	23	6	8	0	8	1	2	0	4
5550	5	3	29	18	34	30	13	21	14	13	4	8	1	4	0	2	0	0
5551	2	4	21	21	33	26	22	12	16	20	5	8	0	6	0	2	1	1
5555	1	1	17	18	33	15	30	18	11	19	3	14	5	6	0	4	0	4
5556	4	2	14	15	28	22	24	19	12	19	9	10	5	5	2	2	2	2
5557	0	0	3	7	6	12	13	13	14	11	15	16	12	11	9	6	15	7
5558	1	1	7	4	11	18	18	16	15	12	10	10	11	11	11	14	7	5
5559	1	1	10	16	13	9	15	9	12	8	14	13	11	10	9	6	8	11

Fortsetzung Tabelle 2b

Vt.-Nr.	Anzahl markierter Glia- (a) und Endothelzellen (b) pro Kornzahlintervall																			
	45 - 49		50 - 54		55 - 59		60 - 64		65 - 69		70 - 74		75 - 79		80 - 84		85 - 89		≥ 90	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
5540	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5541	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5542	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5543	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5544	0	6	1	2	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
5545	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5546	0	1	0	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5547	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5548	0	3	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5549	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5550	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5551	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5555	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5556	0	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5557	3	6	3	4	3	1	1	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
5558	4	4	3	3	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5559	2	7	2	3	1	4	1	2	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

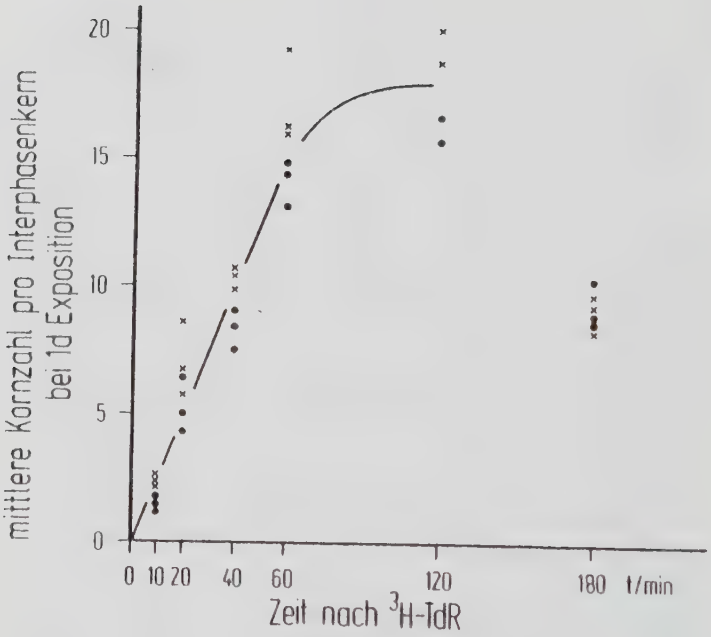

Abb. 3: Mittlere Kornzahl pro markierter Interphasekern für Glia- und Endothelzellen in Cortex und Corpus callosum der 14 Tage alten Ratte als Funktion der Zeit nach Injektion von ^{3}H-TdR

• : Werte für Gliazellen der einzelnen Versuchstiere

x : Werte für Endothelzellen der einzelnen Versuchstiere

Alle Meßwerte wurden auf eine einheitliche Belichtungszeit von 1 Tag Dauer umgerechnet.

In Abb. 3 sind die erhaltenen mittleren Kornzahlen pro Interphasekern für Glia- (Tab. 2a, Spalte VI) und auch Endothelzellen (Tab. 2a, Spalte VII) als Funktion der Zeit nach Injektion von ^{3}H-TdR aufgetragen, wobei alle Meßwerte auf eine einheitliche Belichtungszeit von 1 Tag Dauer umgerechnet wurden. Wie man sieht, liegen die Meßpunkte für Endothelzellen (x) meist oberhalb derjenigen für Gliazellen (•).

Die in Abb. 3 eingezeichnete ausgezogene Kurve gibt den Anstieg der mittleren Kornzahl pro Interphasekern als Funktion der Versuchszeit für Glia- und Endothelzellen zusammen wieder. Die Kurve steigt zunächst bis ca. t = 60 min linear an. Im anschließenden Zeitintervall bis t = 120 min ist der Anstieg wesentlich geringer. Ein Vergleich der mittleren Kornzahlen für Glia- und Endothelzellen bei t = 120 min mit derjenigen bei t = 60 min zeigt, daß eine Stunde nach Versuchsbeginn ca. 90 % des Wertes von t = 2 h erreicht sind.

3 h nach Versuchsbeginn liegen die erhaltenen Meßpunkte deutlich niedriger als bei t = 2 h. Das erklärt sich daraus, daß ein Teil der registrierten Interphasezellen bereits eine Mitose durchlaufen hat.

Dieser Zusammenhang, d.h. daß sich einige der markierten Zellen bereits geteilt haben, wird aus Abb. 4 deutlich: Hier sind (neben einer theoretischen Kurve) auf Grund der registrierten Kornzahlen pro Kern (Tab. 2b) für die Versuchszeiten t = 2 h und t = 3 h kumulative Häufigkeitsverteilungen ($F(n) = P(\underline{n} \geq n)$) der Kornzahl pro Kern in halblogarithmischer Darstellung aufgeführt. Bei diesen kumulativen Häufigkeitsverteilungen wird jeweils als Funktion der Kornzahl pro Kern derjenige Prozentsatz markierter Zellen aufgetragen, der eine bestimmte Kornzahl oder mehr Körner pro Kern aufweist. Kurve A wurde aus den Einzelwerten der beiden Versuchstiere für t = 120 min aufgestellt. Für die Versuchszeit t = 3 h sind die Einzelwerte der drei untersuchten Tiere eingetragen (Symbole: x, o, ■). Kurve B ist eine theoretische Kurve. Diese Kurve gibt diejenige Verteilung wieder, die sich aus Kurve A ergeben würde, wenn die in Kurve A repräsentierten Zellen alle eine Mitose durchlaufen, d.h. jeweils ihre Kornzahl pro Kern um den

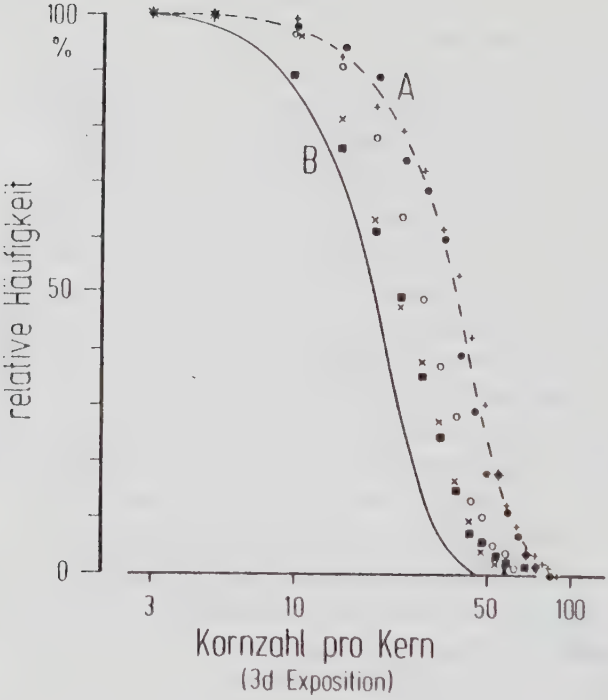

Abb. 4: Kumulative Häufigkeitsverteilungen ($F(n) = P(\underline{n} \geq n)$) der Kornzahl pro Kern für Gliazellen in Cortex und Corpus callosum der 14 Tage alten Ratte

Kurve A: Einzelwerte (+, •) der beiden Versuchstiere für die Zeit t = 2 h nach Injektion von ^{3}H-TdR

Kurve B: Theoretische Kurve (siehe Text)

■, o, x: Einzelwerte der Versuchstiere für die Zeit t = 3 h nach Injektion von ^{3}H-TdR

Die Expositionszeit betrug bei allen Autoradiogrammen 3 Tage.

Faktor 2 verringert hätten. Wie man sieht, liegen die Einzelwerte für t = 3 h deutlich zwischen Kurve A und der theoretischen Kurve B. Das spricht dafür, daß zum Zeitpunkt t = 3 h ein Teil der markierten Interphasezellen bereits eine Mitose durchlaufen hat.

Für eine genaue Bestimmung dieses Teils markierter Interphasezellen müßte man allerdings weitere Messungen durchführen, d.h. Autoradiogramme verwenden, die genauso wie diejenigen für Kurve A belichtet wurden, um Fehler beim Umrechnen auf eine einheitliche Belichtungszeit zu vermeiden. Bei höheren mittleren Kornzahlen - wie sie für t = 3 h mit einer Belichtungszeit von 3 Tagen tatsächlich vorliegen (siehe Tab. 2a) - ist nämlich mit Sättigungseffekten zu rechnen, so daß nach der Umrechnung auf 1 Tag Belichtungszeit zu kleine Werte resultieren. Es wurde hier jedoch auf eine genaue Bestimmung der Meßpunkte für t = 3 h verzichtet, da diese Werte - im Gegensatz zu denjenigen im Zeitintervall t = 10 min bis t = 120 min - für die Bestimmung der maximalen Verfügbarkeitszeit ohne Bedeutung sind.

Wenn man demnach in der zuvor beschriebenen Abb. 3 auch nur das Zeitintervall bis t = 2 h betrachten kann, wird dennoch klar, daß der größte Teil der markierten DNA innerhalb der ersten 60 Minuten nach der ^{3}H-TdR Injektion gebildet wird. Auf Grund des geringen Kurvenanstieges zwischen t = 1 h und t = 2 h dürfte ein weiteres Anwachsen der mittleren Kornzahl pro Kern zu Zeitpunkten t > 2 h höchstens verschwindend gering sein. Zusammenfassend bedeutet das, daß die maximale Verfügbarkeitszeit des ^{3}H-TdR für Glia- und Endothelzellen im Gehirn der 14 Tage alten Ratte zwar ca. 2 h beträgt, jedoch der Zuwachs an markierter DNA in der zweiten Stunde nach der ^{3}H-TdR Injektion nur noch gering ist, d.h. daß die Verfügbarkeitszeit ca. 60 min. beträgt.

3. BESTIMMUNG DER MITTLEREN KORNZAHL PRO FLÄCHENEINHEIT FÜR INTERPHASEN SOWIE FÜR MITOSEN VON GLIA- UND ENDOTHELZELLEN ALS FUNKTION DER ZEIT NACH INJEKTION VON ^{3}H-TdR

3.1. Interphasen

Bei den Auswertungen zur Aufstellung der PLM-Kurve (Kap. III, 1.1.) fiel auf, daß bei Versuchszeiten ab ca. 14 h nach Injektion von ^{3}H-TdR die Interphasezellen sehr unterschiedlich markiert waren. Es schien deshalb von Interesse, die Markierung der Interphasezellen näher zu analysieren. Hierzu wurde für einige der Versuchstiere im Zeitintervall 1 h bis 28 h nach Injektion von ^{3}H-TdR neben der Kornzahl pro Kern auch die relative Anschnittsfläche der markierten Zellen bestimmt (vgl. Kap. II, 6.4.), so daß für jede Zelle die Kornzahl pro Flächeneinheit berechnet werden konnte (Kornzahl pro Kern dividiert durch die relative Kernfläche). Mit diesem Verhältniswert ist die Beurteilung, ob ein Zellkern stark oder schwach markiert ist, besser durchzuführen, da kleine Kornzahlen, die alleine auf kleinen Anschnittsflächen beruhen, hierbei wegfallen.

Eine Analyse der Kornzahl pro Flächeneinheit wurde für die Versuchszeiten t = 1, 2, 8, 14, 16, 18, 20 und 28 h jeweils an 100 markierten Interphasen von Glia- und Endothelzellen pro Tier durchgeführt. Dabei betrug für t = 1 h und t = 2 h die Belichtungszeit der Autoradiogramme 3 Tage, für alle anderen Versuchszeiten einheitlich 28 Tage. Für t = 16 h wurden Autoradiogramme sowohl mit 3-tägiger als auch mit 28-tägiger Belichtungszeit hergestellt. Bei der langen Belichtungszeit von 28 Tagen konnte die Kornzahl der stark markierten Zellen nicht mehr im einzelnen bestimmt werden. Da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, daß ein Registrieren der Kornzahl ab ca. 50 Körner pro Flächeneinheit nicht mehr sicher durchzuführen war, wurden alle Zellen mit $\geq$ 50 Körnern pro Kernfläche zu einer Gruppe zusammengefaßt. Tab. 3 gibt einen Überblick aller erhaltenen Werte.

Tabelle 3: Kornzahl pro Flächeneinheit für markierte Interphasen von Glia- und Endothelzellen im Gehirn der 14 Tage alten Ratte als Funktion der Zeit nach Injektion von ^{3}H-TdR

Vt.-Nr.	Zeit nach ^{3}H-TdR (h)	Bel.-Zeit (d)	♂/♀	Gew. (g)	Anzahl mark. Glia- (a) und Endothelzellen (b) mit Kornzahlintervall (Kornzahl pro Flächeneinheit)											
					3 - 4		5 - 9		10 - 14		15 - 19		20 - 24		25 - 29	
					a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
5549	1	1	♀	35	3	0	8	3	24	15	22	18	29	31	12	15
5550	1	1	♀	25	1	1	9	4	32	14	18	18	19	14	11	16
5551	1	1	♂	32	0	2	13	6	19	16	24	15	32	27	10	21
5555	2	3	♀	26	0	0	0	1	4	3	1	0	2	5	2	4
5556	2	3	♀	29	0	0	0	0	0	2	1	0	5	8	7	3
4041	8	28	♂	32	0	0	3	4	6	12	2	2	3	4	3	1
4053	14	28	♂	27	1	0	5	2	4	3	1	10	9	5	3	7
4055	14	28	♂	27	0	0	0	2	7	3	9	9	3	6	2	3
4758	16	3	♀	23	4	2	13	6	30	15	21	22	20	22	7	7
4759	16	3	♂	24	1	3	14	2	29	24	25	27	24	21	3	12
4761	16	3	♂	23	3	7	11	9	22	9	10	13	14	13	13	13
4758	16	28	♀	23	3	2	7	4	16	17	5	6	5	4	4	3
4760	16	28	♀	22	0	0	1	3	8	6	11	7	11	5	8	2
4761	16	28	♂	23	0	1	5	1	4	3	7	4	10	10	1	7
5252	18	21	♂	28	1	0	3	2	7	7	6	6	4	4	5	6
4775	20	28	♀	31	2	0	1	0	2	5	3	7	10	6	7	8
3970	28	30	♂	19	1	9	3	8	20	14	6	12	7	6	2	4
4068	28	30	♀	32	0	0	0	2	6	1	3	0	23	11	16	14

Fortsetzung Tabelle 5

					30 - 34		35 - 39		40 - 44		45 - 49		≥ 50	
					a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
5549	1	1	♀	35	1	11	0	3	0	0	0	1	0	2
5550	1	1	♀	25	9	13	1	10	0	7	0	1	0	2
5551	1	1	♂	32	1	9	1	5	0	1	0	1	0	1
5555	2	3	♀	26	5	9	14	8	13	14	14	10	35	66
5556	2	3	♀	29	13	7	19	12	11	18	17	6	27	44
4041	8	28	♂	32	3	4	1	0	2	2	0	0	177	171
4033	14	28	♂	27	4	2	4	1	2	2	1	2	66	66
4035	14	28	♂	27	1	8	3	1	3	1	0	0	70	67
4758	16	3	♀	23	5	12	0	6	0	5	0	1	0	2
4759	16	3	♂	24	4	8	0	2	0	1	0	0	0	0
4761	16	3	♂	23	21	13	3	9	0	4	1	1	0	5
4758	16	28	♀	23	3	4	3	2	4	1	4	1	44	56
4760	16	28	♀	22	6	5	1	4	0	2	0	0	54	63
4761	16	28	♂	23	10	3	5	6	3	4	4	4	31	37
5252	18	21	♂	28	2	3	2	4	9	3	2	4	59	61
4775	20	28	♀	31	13	4	6	3	7	1	1	1	46	66
3970	28	30	♂	19	3	3	2	0	3	2	0	1	53	50
4068	28	30	♀	32	13	10	4	5	2	6	1	4	32	47

Abkürzungen: Vt.-Nr. = Versuchstier-Nummer
Belichtungszeit in Tagen
Gewicht in Gramm
mark. = markiert
Endothelzellen
Zeit nach Injektion von ^{3}H-TdR in Stunden

Für die Versuchszeit t = 16 h und eine Belichtungszeit der Autoradiogramme von 28 Tagen ist in Abb. 5 die Kornverteilung der markierten Gliazellen in Histogrammform dargestellt (Aufstellung der relativen Häufigkeitsdichte der Kornzahlen pro Flächeneinheit). Für jedes Kornzahlintervall wurde der Mittelwert von den Einzelwerten dreier Versuchstiere gebildet und der Standardfehler des Mittelwertes berechnet (senkrechte Striche in der Mitte jedes Kornzahlintervalls in Abb. 5). Wie Abb. 5 zeigt, existieren neben den stark markierten Interphasen (≥ 50 Körner pro Flächeneinheit) auch schwach markierte Gliazellen mit einem breiten Maximum zwischen 10 und 24 Körnern pro Kernfläche. Es soll hier nochmals daran erinnert werden, daß auch bei diesen 28 Tage exponierten Autoradiogrammen der Nulleffekt vernachlässigbar klein war, d.h. höchstens 2 Körner pro Flächeneinheit betrug (vgl. Kap. II, 6.3.). Die in Abb. 5 aufgeführten Gliazellen mit Kornzahlen von 3 - 49 pro Flächeneinheit sind also keinesfalls Ausdruck eines hohen Nulleffekts. Ähnliche Histogramme wie in Abb. 5 ergaben sich auch sowohl für Endothelzellen bei t = 16 h als auch für Glia- und Endothelzellen bei t = 18, 20 und 28 h nach Injektion von ^{3}H-TdR.

Zur genaueren Charakterisierung der stark markierten Gliazellen mit ≥ 50 Körnern pro Flächeneinheit wurden von denselben Versuchstieren (t = 16 h) auch Autoradiogramme mit einer kurzen Belichtungszeit von nur 3 Tagen Dauer hergestellt. Diese Autoradiogramme sollen im folgenden mit den unter identischen Bedingungen hergestellten Autoradiogrammen von Versuchstieren mit t = 2 h verglichen werden.

Für diesen Vergleich wurden auf Grund der ermittelten Kornzahlen pro Flächeneinheit (siehe Tab. 3) kumulative Häufigkeitsverteilungen ($F(n) = P(\underline{n} \geq n)$) der Kornzahl pro Flächeneinheit aufgestellt, und zwar in der gleichen Weise, wie bereits in Kap. III, 2. für Abb. 4 beschrieben. In Abb. 6 sind diese kumulativen Häufigkeitsverteilungen in halblogarithmischer Form dargestellt. Kurve A gilt für die Versuchszeit t = 2 h, wobei diese Kurve dem Mittelwert der beiden untersuchten Tiere entspricht; jeder Punkt steht für einen Einzelwert eines Tieres.

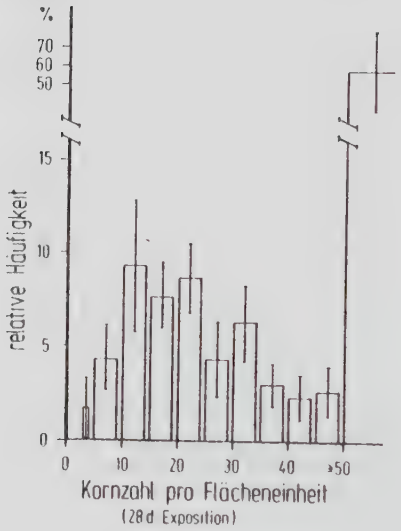

Abb. 5: Relative Häufigkeitsdichte der Kornzahl pro Flächeneinheit für markierte Gliazellen in Cortex und Corpus callosum der 14 Tage alten Ratte 16 h nach Injektion von ^{3}H-TdR

Für jedes Kornzahlintervall (1. Intervall: 3 - 4 Körner pro Flächeneinheit; 2. Intervall: 5 - 9 Körner pro Flächeneinheit; 3. Intervall: 10 - 14 Körner pro Flächeneinheit usw.) ist der Mittelwert von den Einzelwerten dreier Versuchstiere gebildet. Die senkrechten Striche geben den Standardfehler des Mittelwertes an. Die Belichtungszeit der Autoradiogramme betrug 28 Tage.

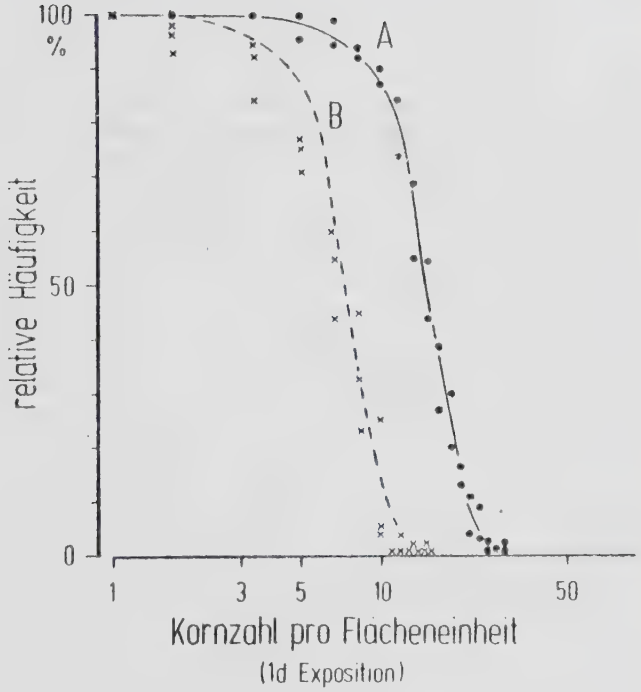

Abb. 6: Kumulative Häufigkeitsverteilungen ($F(n) = P(n \geq n)$) der Kornzahl pro Flächeneinheit für Gliazellen in Cortex und Corpus callosum der 14 Tage alten Ratte

Kurve A: Experimentelle Kurve für t = 2 h
Kurve B: Theoretische Kurve (siehe Text)
Symbole: Summationswerte der einzelnen Versuchstiere

Alle Meßwerte wurden auf eine einheitliche Belichtungszeit von 1 Tag Dauer umgerechnet.

Kurve B ist eine theoretische Kurve ähnlich der Kurve B in Abb. 4: Diese Kurve ist gegenüber Kurve A in der Abszisse jeweils um den Faktor 2 nach links verschoben, d.h. diese Kurve B würde sich aus Kurve A ergeben, wenn alle in Kurve A enthaltenen Zellen einmal die Mitose durchlaufen haben (Halbierung der Kornzahl bei jeder Zelle). Mit dem Symbol "x" sind die einzelnen Meßwerte für die drei Versuchstiere von t = 16 h gekennzeichnet. Wie man sieht, stimmen die Werte mit dem Verlauf der theoretischen Kurve B weitgehend überein. Aus dieser Übereinstimmung läßt sich schließen, daß die stark markierten Zellen (Gliazellen mit ≥ 50 Körnern pro Flächeneinheit in Abb. 5) mit denjenigen Zellen identisch sind, die zu Versuchsbeginn (t = 0 h) mit ^{3}H-TdR markiert wurden und anschließend eine Mitose durchlaufen haben. Für den Zeitpunkt t = 16 h gilt demnach, daß zwei verschiedene Populationen von markierten Glia-Interphasezellen vorhanden sind: Einmal stark markierte Gliazellen, nämlich die zu Versuchsbeginn markierten Zellen, und zum anderen wesentlich schwächer markierte Gliazellen. Das Zahlenverhältnis zwischen beiden Zellgruppen beträgt etwa 1 : 1. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Belichtungszeiten läßt sich - bezogen auf die mittlere Kornzahl pro Flächeneinheit - abschätzen, daß die Gruppe der schwach markierten Gliazellen (mittlere Kornzahl pro Flächeneinheit bei 28 Tagen Belichtung ca. 24) etwa um den Faktor 7 schwächer markiert ist als die stark markierten Gliazellen (mittlere Kornzahl pro Flächeneinheit bei 3 Tagen Belichtungszeit ca. 17).

Um auch für andere Versuchszeiten etwas über die Größe der schwach markierten Zellpopulation aussagen zu können, wurde bei verschiedenen Versuchstieren das Verhältnis von schwach markierten (3 - 49 Körner pro Flächeneinheit) zu allen markierten Glia- und Endothelzellen bestimmt. Dabei betrug die Belichtungszeit der Autoradiogramme einheitlich 28 Tage. In Abb. 7 sind die in Tab. 3 enthaltenen Einzelwerte als Funktion der Zeit nach Injektion von ^{3}H-TdR aufgetragen. Wie man sieht, sind 8 h nach Injektion von ^{3}H-TdR im Mittel von Glia- und Endothelzellen nur etwa 13 % der markierten Interphasezellen schwach markiert. Zum Zeitpunkt t = 14 h hat sich dieser Anteil bereits

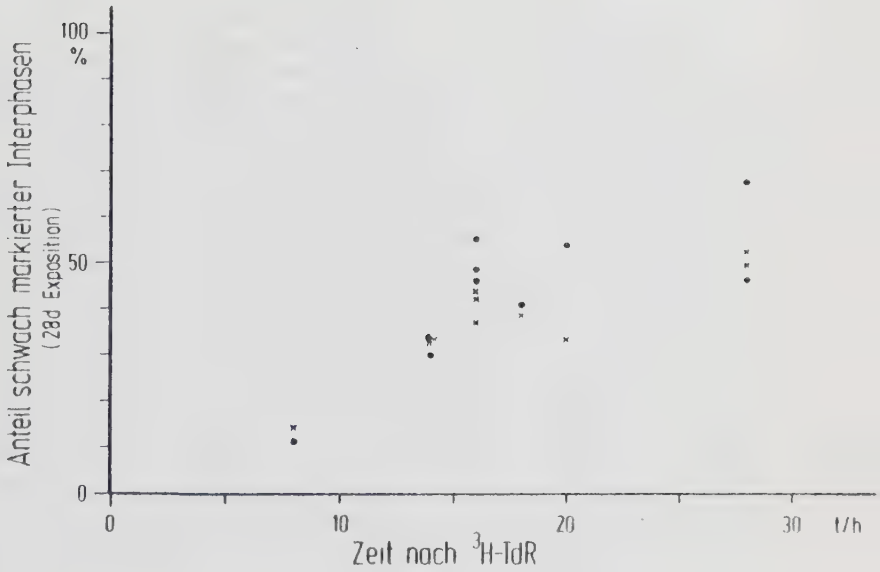

Abb. 7: Anteil schwach markierter Interphasen von Glia- und Endothelzellen in Cortex und Corpus callosum der 14 Tage alten Ratte als Funktion der Zeit nach Injektion von ^{3}H-TdR

• : Meßwerte für Gliazellen der einzelnen Versuchstiere

x : Meßwerte für Endothelzellen der einzelnen Versuchstiere

Die Expositionszeit der Autoradiogramme betrug 28 Tage.

auf ca. 33 % erhöht. Zwischen t = 16 h und t = 28 h finden sich dann Werte zwischen 40 % und 60 %, d.h. der Anteil an schwach und stark markierten Glia- und Endothelzellen ist ungefähr gleich.

3.2. Mitosen

Neben der Bestimmung der Kornzahl pro Flächeneinheit für Interphasen wurden entsprechende Werte auch für Mitosen bestimmt. Hier ist allerdings - bis auf zwei Versuchstiere - die Anzahl der pro Tier registrierten Mitosen gering. Tab. 4 enthält eine Zusammenstellung der Meßwerte. Besonders hervorzuheben ist die Tatsache, daß 8 h nach Versuchsbeginn nur sehr stark markierte Mitosen vorhanden sind, während zum Zeitpunkt t = 20 h der Anteil an diesen stark markierten Mitosen erheblich abgefallen ist und nur noch 6 % beträgt. Jedoch gilt für alle in Tab. 4 aufgeführten Versuchszeiten, daß wahrscheinlich etliche sehr stark markierte Mitosen nicht registriert wurden, weil sie auf Grund ihrer starken Markierung nicht mehr als Mitosen zu erkennen waren. Man muß also davon ausgehen, daß die Anzahl an Mitosen mit ≥ 50 Körnern pro Flächeneinheit größer ist als in Tab. 4 angegeben.

4. BESTIMMUNG DER MITTLEREN KORNZAHL PRO FLÄCHENEINHEIT FÜR MARKIERTE INTERPHASEN VON KRYPTENEPITHELZELLEN DES JEJUNUMS

Zum Vergleich von mittleren Kornzahlen zwischen Zellen des Gehirns und entsprechenden Werten von Zellen außerhalb des Gehirns wurde von markierten Kryptenepithelzellen aus dem Jejunum die mittlere Kornzahl pro Flächeneinheit bestimmt. Für diesen Vergleich wurden Tiere mit einer Versuchszeit von t = 1 h ausgewählt. Tab. 5 enthält die gewonnenen Meßwerte. Im Mittel der drei Versuchstiere ergab sich eine mittlere Kornzahl pro Kern von 21,1 (± 1,0), eine mittlere relative Kernfläche der markierten Zellen von 0,84 (± 0,02) Zählquadraten, d.h. von 27,3 μm^2, und damit eine mittlere Kornzahl pro Flächeneinheit von 25,0 (± 1,6) (jeweils in Klammern: Standardfehler des Mittelwerts).

Tabelle 4: Kornzahl pro Flächeneinheit für markierte Mitosen von Glia- und Endothelzellen im Gehirn der 14 Tage alten Ratte als Funktion der Zeit nach Injektion von ^{3}H-TdR

Vt.-Nr.	Zeit nach ^{3}H-TdR (h)	Bel.-Zeit (d)	♂/♀	Gew. (g)	Anz. reg. Mit.	Anzahl von Mitosen pro Kornzahlintervall					
						0 - 2	3 - 4	5 - 9	10 - 14	15 - 19	20 - 24
4041	8	28	♂	32	69	1	0	0	0	0	0
4033	14	28	♂	27	36	0	0	2	0	7	6
4055	14	28	♂	27	25	0	1	1	2	2	1
4761	16	28	♂	23	13	0	0	0	0	1	2
4775	20	28	♀	31	100	7	0	0	9	23	13
3970	28	30	♂	19	9	0	0	0	1	2	2
4068	28	30	♀	32	16	0	0	0	1	2	0

Abkürzungen: Vt.-Nr. = Versuchstier-Nummer
Belichtungszeit in Tagen
Gewicht in Gramm
Anz. reg. Mit. = Anzahl registrierter Mitosen
Zeit nach Injektion von ^{3}H-TdR in Stunden

Fortsetzung Tabelle 4

Vt.-Nr.	Zeit nach ^{3}H-TdR (h)	Bel.-Zeit (d)	♂/♀	Gew. (g)	Anz. reg. Mit.	Anzahl von Mitosen pro Kornzahlintervall					
						25 - 29	30 - 34	35 - 39	40 - 44	45-49	≥ 50
4041	8	28	♂	32	69	0	0	0	0	0	68
4053	14	28	♂	27	36	2	2	0	1	1	15
4055	14	28	♂	27	25	1	0	1	0	0	15
4761	16	28	♂	23	13	2	3	2	0	0	3
4775	20	28	♀	31	100	17	10	8	7	0	6
3970	28	30	♂	19	9	0	1	0	0	1	2
4068	28	30	♀	32	16	2	4	0	1	1	3

Abkürzungen: Vt.-Nr. = Versuchstier-Nummer
Belichtungszeit in Tagen
Gewicht in Gramm
Anz. reg. Mit. = Anzahl registrierter Mitosen
Zeit nach Injektion von ^{3}H-TdR in Stunden

Tabelle 5: Mittlere Kornzahl pro Kern, mittlere relative Kernfläche sowie mittlere Kornzahl pro Flächeneinheit bei Kryptenepithelzellen aus dem Jejunum der 14 Tage alten Ratte 1 h nach Injektion von ^{3}H-TdR

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Vt.-Nr.	Gew. (g)	♂/♀	Anzahl ausgez. Zellen	mittl. Kornz. /Kern	mittl. rel. Kernfl. (Zähl-quadr.)	mittl. rel. Kernfl. (μm^2)	mittl. Kornz./Flächeneinheit (V/VI)
5549	35	♀	100	21.2	0.87	28.3	24.4
5550	25	♀	100	22.7	0.81	26.3	28.0
5551	32	♂	100	19.3	0.85	27.6	22.7

Die Belichtungszeit betrug bei allen Autoradiogrammen 1 Tag.

Abkürzungen: Vt.-Nr. = Versuchstier-Nummer
Gewicht in Gramm
Anz. ausgez. Zellen = Anzahl ausgezählter Zellen
mittl. Kornz. = mittlere Kornzahl
mittl. rel. Kernfl. = mittlere relative Kernfläche
Zählquadr. = Zählquadrat

IV. DISKUSSION

1. ZUR WAHL UNTERSCHIEDLICHER AUTORADIOGRAPHISCHER BELICHTUNGSZEITEN BEI DER AUFSTELLUNG DER PLM-KURVE FÜR GLIA- UND ENDOTHELZELLEN

Wie die weitere Diskussion noch zeigen wird, spielen in dieser Untersuchung die Belichtungszeiten der zur Aufstellung der PLM-Kurve ausgewerteten Autoradiogramme eine wesentliche Rolle. So betrug die Belichtungszeit für die Versuche bis etwa 10 h nach Injektion von ^{3}H-TdR 8 Tage; die Belichtungszeit wurde mit fortschreitender Versuchszeit verlängert bis zu maximal 60 Tagen (z.B. für die Versuche 40 h nach ^{3}H-TdR). Diese Verlängerung der Belichtungszeit erfolgte aus folgenden Gründen: Aus der Zusammenstellung früherer Meßwerte bei Ratten gleichen Alters hatte sich gezeigt (Schilling 1978; Dauenhauer 1980), daß bei einer einheitlichen Belichtungszeit von 8 Tagen ein Teil der Mitosen bei Versuchszeiten von 14 h und mehr nur sehr schwach markiert war. Diese Mitosen wiesen meist 1 - 4 Körner pro Kern auf, wobei ihre Kernanschnittsflächen - besonders bei Meta- und Anaphasen - oftmals sehr klein, d.h. kleiner waren als die Hälfte der mittleren Anschnittsfläche von Interphasen. Wenn auch die Autoradiogramme nur einen vernachlässigbar kleinen Nulleffekt aufwiesen, war es doch in vielen Fällen schwierig, bei diesen Mitosen die Entscheidung zu treffen, ob eine Markierung vorlag oder nicht.

Auf der anderen Seite waren keine Argumente gegen das Vorhaben bekannt, über eine längere Belichtungszeit zu einer höheren Kornzahl pro Kern zu kommen. Insbesondere am Gehirn schien die Gefahr, durch längere Belichtungszeiten evtl. eine schwache Markierung durch Wiederverwendung von ^{3}H-markierten DNA-Metaboliten zu erhalten, ausgeschlossen: Einerseits dürfte diese Markierung im Vergleich zur direkten Markierung sehr viel geringer sein (siehe dazu später Kap. IV, 5.).

Andererseits ist nach Untersuchungen von Schultze et al. (1972) und Knorre (1979) zur Markierung von Glia- und Endothelzellen im Gehirn adulter Mäuse wegen der Existenz einer Blut-Hirn-Schranke gegenüber TdR etwa 8 - 10 mal mehr radioaktiv markiertes TdR notwendig als zur Markierung einer Körperzelle. Wenn es auch für junge Tiere noch keine Meßwerte hinsichtlich der Existenz einer Blut-Hirn-Schranke gegenüber TdR gibt, schien es doch naheliegend zu sein, daß hier ähnliche Verhältnisse vorliegen wie beim adulten Tier. Insgesamt gesehen schien es also möglich zu sein, über eine Verlängerung der autoradiographischen Belichtungszeit auch bei kleinen Mitoseanschnitten zu einer sicheren Unterscheidung zwischen markierten und unmarkierten Mitosen zu kommen und damit eine genaue PLM-Kurve zu erhalten.

2. VERGLEICH DER AUS DER PLM-KURVE ABGELEITETEN ZELLZYKLUSPARAMETER MIT LITERATURANGABEN

2.1. Vergleich mit Zellzyklusparametern für Glia- und Endothelzellen der 14 Tage alten Ratte, die mit Hilfe anderer Methoden erhalten wurden

Für die Glia- und Endothelzellen in Cortex und Corpus callosum der 14 Tage alten Ratte (also für die gleichen Zellarten in den gleichen Hirnregionen und auch für gleichaltrige Tiere desselben Rattenstammes wie in der vorliegenden Untersuchung) liegen bereits Werte für die S-Phasendauer und den Zellzyklus vor, die mit anderen zellkinetischen Methoden erhalten wurden: So bestimmte Schilling (1978) mit Hilfe von Doppelmarkierungsversuchen mit ^{3}H- und ^{14}C-TdR sowohl die Dauer der S-Phase (T_S) als auch die Dauer der Generationszeit (T_C), und zwar für Glia- und - getrennt davon - auch für Endothelzellen jeweils in vier verschiedenen Vorderhirnarealen (Cortex, Corpus callosum, Nucleus caudatus und Commissura anterior).

Für die S-Phasendauer erhielt Schilling (1978) im Falle der Gliazellen im Cortex 10,1 h $\pm$ 0,6 h und im Corpus callosum

10,1 h ± 0,7 h. Für die Endothelzellen wurde T_S = 9,9 h ± 1,0 h (Cortex) und 8,9 h ± 1,2 h (Corpus callosum) ermittelt. Damit ergibt sich eine gute Übereinstimmung zu dem hier bestimmten Wert T_S = 10 - 11 h.

Im Falle der Dauer der Generationszeit (T_C) ist dagegen eine erhebliche Diskrepanz zwischen dem hier ermittelten Wert von 12 - 13 h und den Ergebnissen von Schilling (1978) mit T_C = 20 h festzustellen. Dieser letzte Wert wurde mit Hilfe der "Methode der markierten S-Phasen" bestimmt, einer speziellen Doppelmarkierungsmethode mit ^{3}H- und ^{14}C-TdR (siehe dazu Korr et al., 1975; Korr 1978, 1980). Außerdem wurde diese Zeitspanne T_C = 20 h für Glia- und Endothelzellen in Cortex und Corpus callosum der 14 Tage alten Ratte auch mit einer weiteren, von den bisher angeführten völlig unabhängigen Methode erhalten, nämlich aus dem Abfall der mittleren Kornzahl pro Kern als Funktion der Zeit nach einer einmaligen Injektion von ^{3}H-TdR ("grain-count halving method"; Dauenhauer 1980; siehe auch Korr, 1978).

2.2. Vergleich mit Zellzyklusparametern für verschiedene Zelltypen des Gehirns während der prä- und postnatalen Ontogenese

Abb. 8 enthält (entnommen aus Korr 1980) eine Zusammenstellung aller bisher ermittelten Werte T_S (oben) und T_C (unten) für sechs verschiedene Zelltypen des Gehirns von Ratte und Maus während der prä- und postnatalen Ontogenese, und zwar für Ventrikelzellen des Neuralrohres, Matrixzellen der Retina, Zellen in der äußeren Körnerschicht des Cerebellums, Zellen in der subependymalen Schicht des II. Ventrikels, Astrocyten plus Oligodendrocyten und Endothelzellen.

Übereinstimmend bei allen Zelltypen sind S-Phasendauer und Zykluszeit während der frühen Embryonalzeit sehr kurz (T_S ca. 5 h; T_C ca. 8 h). Diese Zeitspannen verlängern sich mit zunehmendem embryonalen Alter. Gegen Ende der Fetalzeit werden für die angeführten Zellarten im Gehirn von Nagern Werte für T_S zwischen 7 h und 10 h und für T_C von 18 h bis 20 h gemessen.

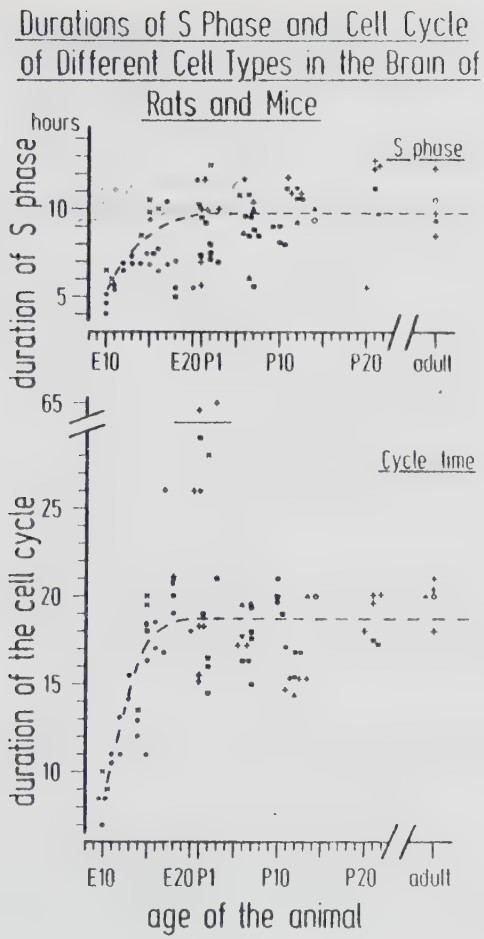

Abb. 8: Dauer von S-Phase (oben) und Zellzyklus (unten) für verschiedene Zellarten im Gehirn von Ratte und Maus als Funktion des prä- und postnatalen Lebensalters der Tiere

Symbole: ●: Ventrikelzellen des Neuralrohres
x: Matrixzellen der Retina
■: Zellen in der äußeren Körnerschicht des Cerebellums
+: Zellen in der subependymalen Schicht des zweiten Ventrikels
▲: Astrocyten und Oligodendrocyten
o: Endothelzellen

Entnommen aus Korr (1980)

T_S und T_C bleiben dann im Verlauf des postnatalen Lebens für die noch weiterhin proliferierenden Zellarten in etwa konstant; das gilt auch für die wenigen proliferierenden Zellen im Gehirn adulter Mäuse (vgl. Korr et al. 1973, 1975).

Wenn man die in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der PLM-Methode für Glia- und Endothelzellen im Gehirn der 14 Tage alten Ratte gefundenen Werte mit denjenigen in Abb. 8 vergleicht, ergibt sich für T_S eine gute Übereinstimmung. Im Falle der Zykluszeit ist jedoch die hier mit der PLM-Methode gemessene Zeitspanne von 12 - 13 h weitaus kürzer als bei allen anderen, während der frühen postnatalen Lebensphase im Gehirn von Ratte und Maus proliferierenden Zellarten. Zusammen mit den im vorigen Abschnitt 2.1. beschriebenen Diskrepanzen wird damit deutlich, daß die hier gefundene Zykluszeit von 12 - 13 h Dauer sehr unwahrscheinlich ist.

Zur Klärung der aufgetretenen Diskrepanz soll in den folgenden Kapiteln dargelegt werden, welche Gründe möglicherweise dafür verantwortlich zu machen sind.

3. EINFLUSS DER VERFÜGBARKEITSZEIT VON ^{3}H-TdR AUF DIE BESTIMMUNG VON ZELLZYKLUSPARAMETERN

Eine wesentliche Voraussetzung für die Bestimmung von Zellzyklusparametern aus dem Verlauf einer PLM-Kurve besteht darin, daß durch die Injektion von ^{3}H-TdR eine Pulsmarkierung erfolgt. Das Intervall, innerhalb dessen Zellen markiert werden können, darf also im Vergleich zur S-Phasendauer nur kurz sein. Diese Voraussetzung muß auch für die anderen, in Abschnitt IV.2. genannten Methoden zur Bestimmung der Zeitspannen von Zellzyklus und seiner Teilphasen (Doppelmarkierungsmethoden, "grain-count halving method") erfüllt sein. Damit stellt sich hier für die Zellen des Gehirns die Frage nach der Verfügbarkeitszeit des injizierten ^{3}H-TdR. Nach den in Kap. III.2. aufgestellten Definitionen des Begriffs "Verfügbarkeitszeit" muß zweierlei überprüft werden: 1) die Zeitspanne, in der ^{3}H-TdR den Zellen von außen über den Blutweg angeboten wird, und 2) das Zeitintervall, innerhalb dessen intrazellulär vom vorhan-

denen ^{3}H-TdR fällbare ^{3}H-markierte DNA synthetisiert wird.

ad 1) Im Blutplasma ist bereits eine Minute nach i.v. Injektion von ^{3}H-TdR eine hohe Konzentration der injizierten Substanz festzustellen (Skougaard und Steward, 1966). Diese fällt jedoch mit fortschreitender Zeit exponentiell, d.h. sehr rasch, ab. Für den exponentiellen Abfall wurde bei der adulten Maus eine Halbwertszeit von 2,9 min gemessen (Skougaard und Stewart, 1966); die Bestimmung von Chang und Looney (1965) bei der adulten Ratte mit Halbwertszeiten von 8 min und (zu späteren Zeitpunkten nach der ^{3}H-TdR Injektion) 20 min dürften nicht ganz exakt sein, d.h. die Zeitspannen sind wahrscheinlich zu lang (vgl. dazu Nowakowski und Rakic, 1974). Für 15 Tage alte Ratten, also junge Tiere in einem ähnlichen Alter wie hier untersucht, fanden Carlsson et al. (1979) eine Halbwertszeit von 12 min. Interessanterweise erhielten diese Autoren für 30 Tage alte Ratten eine kürzere Halbwertszeit (10 min). Wenn auch die angeführten Halbwertszeiten der verschiedenen Untersuchergruppen wegen unterschiedlicher Bestimmungsmethoden nicht ohne Vorbehalt zu vergleichen sind (siehe dazu Nowakowski und Rakic (1974) und Carlsson et al. (1979)), wird dennoch klar, daß im Plasma eine hohe Konzentration von ^{3}H-TdR, die für einen autoradiographischen Nachweis mit kurzen Belichtungszeiten nötig ist, nur für kurze Zeitspannen (ca. 15 min) vorhanden sein dürfte. Wenn man jedoch die Autoradiogramme sehr lang belichtet, läßt sich auch zu späteren Stunden noch ein Einbau von ^{3}H-TdR in die DNA nachweisen. So zeigten Brière und Isler (1966), daß noch 30 h nach einer einmaligen Injektion von ^{3}H-TdR im Blutserum junger Ratten genügend markierte Substanz vorhanden war, um damit - bei einer Belichtungszeit der Autoradiogramme von drei Monaten - die Kerne von Zellen in Kultur (sehr schwach) zu markieren. Insgesamt gesehen dürfte man - wenn man die ^{3}H-TdR-Konzentrationen im Serum berücksichtigt - dennoch davon ausgehen, daß - jedenfalls vom Zufluß des injizierten ^{3}H-TdR vom Blut zu den Zellen her gesehen - in etwa die Bedingung "Pulsmarkierung" erfüllt ist. Die oben angeführten schwachen ^{3}H-TdR Konzentrationen werden bei den üblichen Belichtungszeiten nicht zu markierten Zellen führen.

ad 2) Im Hinblick auf das intrazelluläre Geschehen, d.h. der mit fortschreitender Zeit erfolgenden Synthese von fällbarer, durch die histologische Aufarbeitung der Gewebe nicht mehr lösbarer DNA, liegen mit dieser Arbeit erstmals Meßwerte für Zellen innerhalb des Gehirns vor. Wie Abb. 3 zeigt, ist bereits wenige Minuten nach der ^{3}H-TdR Injektion eine für einen autoradiographischen Nachweis genügende Menge von ^{3}H-DNA gebildet worden. Damit liegen im Gehirn ähnliche Verhältnisse vor wie bei anderen Körperzellen, z.B. wie bei Epithelzellen der Dünndarmkrypten (siehe dazu Quastler und Sherman, 1959; Koburg und Maurer, 1962; Kappeler, 1977).

Die maximale Zeitspanne, innerhalb derer in der Zelle fixierbare ^{3}H-DNA synthetisiert wird (maximale Verfügbarkeitszeit im Sinne der zweiten Definition in Kap. III.2.), wurde hier mit ca. 2 h abgeschätzt. Diese Zeitspanne dürfte jedoch mehr von theoretischem Interesse sein; ein meßbarer Zuwachs an markierter DNA dürfte (bei üblichen Belichtungszeiten) nur innerhalb von etwa 60 min erfolgen. Dennoch ist diese Zeitdauer wesentlich länger als diejenige für die Kryptenepithelzellen (Maus: ca. 40 min, wobei jedoch schon nach 15 min ca. die Hälfte des Maximalwerts erreicht wird (Koburg und Maurer, 1962)). Auf Grund der hier bestimmten maximalen Verfügbarkeitszeit ergeben sich nun Anhaltspunkte zur Beantwortung der Frage nach einer Pulsmarkierung, wenn man außerdem noch Ergebnisse von Pelc und Appleton (1965) heranzieht: Diese Autoren zeigten mit Hilfe der Autoradiographie wasserlöslicher Substanzen, daß im Gehirn der adulten Maus bei Zellen außerhalb der S-Phase auch noch eine Stunde nach i.p. Injektion von ^{3}H-TdR Radioaktivität im Cytoplasma und Kern der Zellen vorhanden ist. Leider wird dabei nicht mitgeteilt, welche Zellarten des Gehirns untersucht wurden. Bei derartigen autoradiographischen Untersuchungen ist weiterhin nicht bekannt, welche Substanzen im einzelnen in der Zelle durch die Markierung repräsentiert werden, d.h. ob noch ^{3}H-TdR vorhanden ist oder aber schon ^{3}H-markierte Metabolite des TdR, die nicht mehr zu fixierbarer ^{3}H-DNA synthetisiert werden können. Es ist also streng genommen nicht zu sagen, ob auf Grund der intrazellulär vorhandenen ^{3}H-markierten Substanzen eine Zelle, die z.B. 1 h nach ^{3}H-

TdR Injektion in die S-Phase eintritt, noch - wenn auch nur sehr schwach - markiert wird. Für eine derartige Möglichkeit könnte höchstens die in Abb. 3 wiedergegebene Tatsache sprechen, daß es zwischen 1 h und 2 h nach ^{3}H-TdR Injektion noch zu einer Vermehrung der Kornzahl pro Kern und damit auch von ^{3}H-DNA kommt. Auf die Problematik, die in der Beziehung zwischen Kornzahl pro Kern und Menge markierter DNA liegt, soll hier nur hingewiesen, jedoch nicht näher eingegangen werden (siehe dazu z.B. Schultze, 1969).

Wenn die vorhin erwähnte Markierungsmöglichkeit tatsächlich existieren sollte, ist weiterhin zu fragen, ob die Menge an neu synthetisierter ^{3}H-DNA für einen autoradiographischen Nachweis ausreichend groß ist, d.h. ob die dann markierten Zellen auch noch autoradiographisch nachzuweisen sind. Leider machen Pelc und Appleton (1965) keine Angaben zu den Belichtungszeiten, die ihren publizierten Kornzahl-Histogrammen zugrunde liegen. Es können somit keine weiteren Überschlagsrechnungen für die hier untersuchten Zellen durchgeführt werden. Damit bleibt schließlich auch unklar, ob bei längeren autoradiographischen Belichtungszeiten - wie sie nur bei den PLM-Versuchen durchgeführt wurden - mit der hier diskutierten Markierung zu rechnen ist.

In dem hypothetischen Fall, daß für Glia- und Endothelzellen keine Pulsmarkierung, sondern ein Markierungszeitraum von 1 h - 2 h Dauer vorliegt, würde die zu untersuchende Gruppe markierter Zellen nicht mehr T_S proportional sein, sondern einem größeren Zeitintervall. Das würde bei Anwendung der PLM-Methode zu zu großen Zeitspannen für T_S und T_C führen - eine Folgerung, für die die in Kap. III.1. vorgelegten Daten jedoch keine Anhaltspunkte liefern.

Wenn auch noch einige Punkte offenbleiben, sieht es zusammenfassend doch so aus, daß nach einer einmaligen Injektion von ^{3}H-TdR auch für die Zellen des Gehirns eine Pulsmarkierung vorliegt. Damit ergibt sich hier im Hinblick auf die in Kap. IV.2. aufgezeigten Diskrepanzen keine Lösungsmöglichkeit.

4. VORLIEGEN EINER BLUT-HIRN-SCHRANKE GEGENÜBER TdR BEI GLIA- UND ENDOTHELZELLEN IM GEHIRN DER 14 TAGE ALTEN RATTE

Wie bereits in Kap. IV.1. erwähnt, lagen Untersuchungen zur Existenz einer Blut-Hirn-Schranke (BHS) bei der 14 Tage alten Ratte bisher nicht vor. Es war anzunehmen, daß - ähnlich wie bei der adulten Maus (Schultze et al., 1972; Knorre, 1979) - auch bei der jungen Ratte zur Markierung von Zellen innerhalb des Gehirns ca. 10 mal mehr ^{3}H-TdR notwendig ist als zur vergleichbaren Markierung einer Körperzelle. Für diese Gleichsetzung sprachen im übrigen auch Befunde von Shimoda (1963), der bei Ratten eine BHS gegenüber Trypanblau und Ferritin bereits vom 15. Fetaltag an nachgewiesen hatte, sowie Ergebnisse von Olsson und Klatzo (1968), die eine Undurchlässigkeit der Gehirngefäße gegenüber Albumin ebenfalls vom 15. Fetaltag an gezeigt hatten.

Zur experimentellen Überprüfung der bisherigen Annahmen für die 14 Tage alte Ratte wurden für die Versuchszeit t = 1 h Kornzählungen pro Flächeneinheit außer bei Glia- und Endothelzellen des Gehirns auch bei Kryptenepithelzellen des Jejunums vorgenommen. Tab. 6 enthält eine Zusammenstellung der hier für einen Vergleich interessierenden Meßwerte. Da jeweils unter identischen Bedingungen hergestellte Autoradiogramme ausgewertet wurden, lassen sich die Verhältniswerte V_G = Kornzahl pro Flächeneinheit bei Kryptenepithelzellen zu Kornzahl pro Flächeneinheit bei Gliazellen und V_E = Kornzahl pro Flächeneinheit bei Kryptenepithelzellen zu Kornzahl pro Flächeneinheit bei Endothelzellen direkt angeben (Tab. 6, Spalte XI, XII). Im Falle der Gliazellen ergab sich im Mittel $V_G = 1{,}48 \pm 0{,}11$, bei den Endothelzellen $V_E = 1{,}16 \pm 0{,}07$ (jeweils arithmetisches Mittel $\pm$ Standardfehler des Mittelwertes).

Die hier experimentell ermittelten Verhältniswerte V_G und V_E sind damit deutlich von denjenigen unterschieden, die auf die gleiche Weise für die Glia- und Endothelzellen im Gehirn der adulten Maus bestimmt wurden und ca. 10 betragen. Für das Gehirn der 14 Tage alten Wistar-Ratte ist somit nur eine sehr geringe BHS gegenüber TdR ausgebildet.

Tabelle 6: Kornzahl pro Kern, relative Kernanschnittsflächen sowie Kornzahl pro Flächeneinheit für Interphasen von Glia- und Endothelzellen des Gehirns sowie Kryptenepithelzellen des Jejunums bei der 14 Tage alten Ratte 1 h nach Injektion von ^{3}H-TdR

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Vt.-Nr.	Gliazellen			Endothelzellen			Krpytenzellen			Verhältniswerte	
	Sk/K	rel. Kfl.	Sk/ Fl.	Sk/K	rel. Kfl.	Sk/ Fl.	Sk/K	rel. Kfl.	Sk/ Fl.	X/IV	X/VII
5549	14.3	0.84	17.0	19.2	0.88	21.8	21.2	0,87	24.4	1.44	1.15
5550	13.1	0.79	16.6	16.1	0.74	21.8	22.7	0.81	28.0	1.69	1.28
5551	14.8	0.85	17.4	16.2	0.75	21.6	19.3	0.85	22.7	1.30	1.05

Die Belichtungszeit betrug bei allen Autoradiogrammen 1 Tag.

Abkürzungen: Fl. = Flächeneinheit
K = Kern
rel. Kfl. = relative Kernfläche
Sk = Silberkornzahl

5. MARKIERUNG PROLIFERIERENDER GLIA- UND ENDOTHELZELLEN DURCH WIEDERVERWENDUNG ^{3}H-MARKIERTER DNA-METABOLITE

5.1. Hinweise für das Vorliegen einer Markierung durch Wiederverwendung

Nachdem sich die bisherige Annahme als falsch erwiesen hat, daß eine Blut-Hirn-Schranke gegenüber TdR ähnlich wie bei der adulten Maus auch bei der 14 Tage alten Ratte vorliegt, muß die Frage nach einer Markierung von Zellen im Gehirn auf Grund einer Wiederverwendung ^{3}H-markierter DNA-Metabolite oder ^{3}H-DNA-Bruchstücke erneut aufgegriffen werden (siehe auch Kap. IV.1.).

Bei der Wiederverwendung von markierten DNA-Vorläufern kommt es einige Zeit nach der ^{3}H-TdR Injektion zu einer weiteren Markierung proliferierender Zellen. Dabei stammt der markierte Vorläufer der DNA-Synthese von der markierten DNA abgestorbener Zellkerne, z.B. von markierten Normoblasten, bei denen bekanntlich während der Erythropoese die Kerne aus dem Cytoplasma ausgestoßen werden. Eine Übersicht zum Problemkreis Wiederverwendung findet sich z.B. bei Feinendegen (1967), Cleaver (1967) und Schultze (1969).

Zwei Punkte des Phänomens Wiederverwendung sollen an Hand der Literatur näher charakterisiert werden, nämlich 1) das Zeitintervall, in dem mit einer Markierung durch Wiederverwendung zu rechnen ist, und 2) das Ausmaß dieser Markierung, d.h. die dabei beobachteten Kornzahlen pro Kern.

ad 1) Nach Untersuchungen von Stöcker und Pfeifer (1967) und Schultze et al. (1973) an der regenerierenden Leber von Ratte und Maus muß bereits etwa 7 h - 8 h nach einer ^{3}H-TdR Injektion mit einer Markierung von Interphasezellen durch Wiederverwendung gerechnet werden: Bei diesen Untersuchungen fanden sich die ersten schwach markierten Mitosen, die auf eine Markierung durch Wiederverwendung von ^{3}H-DNA-Abbauprodukten zurückgeführt wurden, etwa 11 h - 12 h nach der initialen ^{3}H-TdR Injektion, d.h. bei einer Dauer der G_2-Phase von 4 h - 5 h müssen die zugehörigen Interphasezellen also etwa 7 h - 8 h

nach der ^{3}H-TdR Injektion markiert worden sein.

Das Zeitintervall, in dem insgesamt eine Markierung durch Wiederverwendung möglich ist, kann direkt nicht angegeben werden: Es dürfte - vom Standpunkt des Angebots an zur DNA-Markierung führenden Substanz her gesehen - von längerer Dauer sein. Ob es allerdings während dieser ganzen Zeitspanne zu einer Markierung kommen kann, wird weitgehend von der Menge der angebotenen markierten Substanz abhängen.

ad 2) Das Ausmaß einer Markierung durch Wiederverwendung scheint, wie den folgenden Literaturangaben zu entnehmen ist, gering zu sein; diese Markierung war jeweils nur über lange Belichtungszeiten der Autoradiogramme nachzuweisen. Stöcker und Pfeifer (1967) schätzten bei der regenerierenden Rattenleber das Kornzahlverhältnis zwischen den durch die initiale ^{3}H-TdR Injektion markierten zu den durch Wiederverwendung markierten Mitosen auf ca. 30 : 1 bis 40 : 1. Demgegenüber betrug dieses Verhältnis für Mitosen regenerierender Leberparenchymzellen der Maus nach Untersuchungen von Schultze et al. (1973) ca. 10 : 1.

Zu diesen Charakteristika einer Markierung durch Wiederverwendung bei regenerierenden Leberparenchymzellen adulter Tiere liegen nun einige Parallelen in den hier vorgelegten Befunden vor: Wie Abb. 5 und 6 zeigen, finden sich nach längeren Expositionszeiten der Autoradiogramme auch bei Glia- und Endothelzellen im Gehirn der 14 Tage alten Ratte neben stark markierten Interphasen, die offensichtlich durch die initiale ^{3}H-TdR Injektion markiert wurden, auch sehr schwach, d.h. etwa um den Faktor 7 schwächer, markierte Zellen. Dabei ist diese Zahlenangabe, d.h. der Faktor 7, nur als grobe Abschätzung anzusehen. Wegen der willkürlichen Abgrenzung von schwach zu stark markierten Zellen dürfte der Faktor wahrscheinlich größer als 7 sein.

Auch das Zeitintervall, in dem diese Gruppe schwach markierter Zellen auftritt, paßt zum Phänomen Wiederverwendung: Es liegen hier zwar keine Meßwerte an Interphasezellen für Versuchszeiten $t < 8$ h vor, jedoch deutet die Tatsache, daß

zum Zeitpunkt t = 8 h noch keine schwach markierten Mitosen gefunden wurden, darauf hin, daß zu einem früheren Zeitpunkt, als diese Mitosen in S waren, also zum Zeitpunt $t = (8 - T_{G_2})$ h, d.h. etwa 6 h nach ^{3}H-TdR Injektion, auch noch keine schwach markierten Interphasen vorhanden waren. Zu späteren Zeitpunkten t = 14 h - 28 h wurden stets sowohl schwach markierte Interphasen als auch Mitosen gefunden.

Wenn - wie bei der regenerierenden Leber - auch den Zellen des Gehirns etwa vom Zeitpunkt 7 h - 8 h nach Injektion von ^{3}H-TdR markierte DNA-Abbauprodukte, die wiederum zur Neubildung von ^{3}H-DNA führen können, kontinuierlich über einen längeren Zeitraum zur Verfügung stehen, ist anzunehmen, daß mit fortschreitender Zeit auch die bisher nicht markierten proliferierenden Zellen ^{3}H-markiert werden. Dabei ist auf Grund der bereits erwähnten Untersuchungen von Schilling (1978) und Dauenhauer (1980) zu erwarten (T_S betrug hier ca. 1/2 T_C), daß diese zum Zeitpunkt der ^{3}H-TdR Injektion nicht markierte Gruppe proliferierender Zellen etwa gleich groß ist wie die Gruppe der initial markierten Glia- und Endothelzellen. Wie Abb. 7 zeigt, trifft diese Folgerung ab ca. t = 16 h tatsächlich zu. Damit ergibt sich ein weiteres Argument für die Annahme, daß die in Abb. 5 aufgezeigte Zellpopulation mit 3 - 49 Körnern pro Flächeneinheit nicht zur Zeit t = 0, also durch die initiale ^{3}H-TdR Injektion markiert worden ist, sondern später durch Wiederverwendung.

Wegen des vorhin postulierten Aufmarkierens aller proliferierenden Zellen ist weiterhin zu erwarten, daß von einem bestimmten Zeitpunkt an alle Mitosen markiert sind. Die hier vorliegenden Ergebnisse stehen jedoch mit dieser Forderung nicht in Einklang: Wie Abb. 2 zeigt, fällt der Prozentsatz markierter Mitosen vom Zeitpunkt t = 20 h an auf Werte zwischen ca. 60 % bis 80 % ab. Über die Ursache dieses Abweichens von der theoretischen Erwartung können derzeit nur Vermutungen angestellt werden: So fällt auf (Tab. 1, Spalte VI), daß der Anteil an Mitosen mit 1 - 2 Körnern pro Kern, d.h. also an denjenigen Mitosen, die auf Grund der gewählten Zählgrenze als unmarkiert gewertet wurden, von t = 22 h an stark

zunimmt. Vielleicht würde hier eine genauere Analyse, die auch die Anschnittsfläche der registrierten Mitosen berücksichtigt, zu einer Klärung führen. Weiterhin ist zu erwähnen, daß auch bei den Untersuchungen von Stöcker und Pfeifer (1967) und Schultze et al. (1973) der Prozentsatz markierter Mitosen vom Maximalwert wieder innerhalb weniger Stunden abfiel.

5.2. Auswirkung der Markierung durch Wiederverwendung auf die Bestimmung von Zellzyklusparametern

Wie im vorigen Abschnitt 5.1. dargelegt wurde, macht sich eine Markierung durch Wiederverwendung nur dann auf Grund der sehr geringen Radioaktivität bemerkbar, wenn die Autoradiogramme lange, d.h. bei den hier applizierten Aktivitäten länger als 20 Tage belichtet wurden. Für die bereits mehrfach erwähnten Untersuchungen von Schilling (1978) und Dauenhauer (1980) erübrigt sich damit eine Diskussion über eine mögliche Auswirkung einer Markierung durch Wiederverwendung: In beiden Fällen wurde nämlich zum Nachweis der ^{3}H-Markierung nur kurz belichtet, d.h. 3 Tage (Schilling) bzw. 8 Tage (Dauenhauer) lang. Zwar waren bei Schilling (1978) für das Auffinden von ^{14}C-markierten Glia- und Endothelzellen auch lange Belichtungszeiten bis zu 30 Tagen notwendig; wenn man aber berücksichtigt, daß die applizierte ^{14}C-Aktivität wesentlich geringer war (im Vergleich zu der hier injizierten Dosis ca. 30 mal weniger), ist es recht unwahrscheinlich, daß hier markierte Zellen registriert wurden, die allein auf Grund einer Wiederverwendung von ^{14}C-DNA-Metaboliten markiert worden sind.

Die Auswirkung der Markierung durch Wiederverwendung für die hier durchgeführten Untersuchungen nach der PLM-Methode soll an Hand eines Phasendiagramms für die Gliazellen dargestellt werden (Abb. 9). Hierbei wurde - unter Zugrundelegung der von Schilling (1978) und Dauenhauer (1980) erhaltenen Zellzyklusparameter - eine Zuordnung der Untersuchungszeit zur Lage der proliferierenden Gliazellen in den einzelnen Zellzyklusphasen vorgenommen. Für den Zeitpunkt t = 20 h - dieser Zeitpunkt soll im folgenden als typisches Beispiel näher erläutert werden - sieht man, daß sich die initial mar-

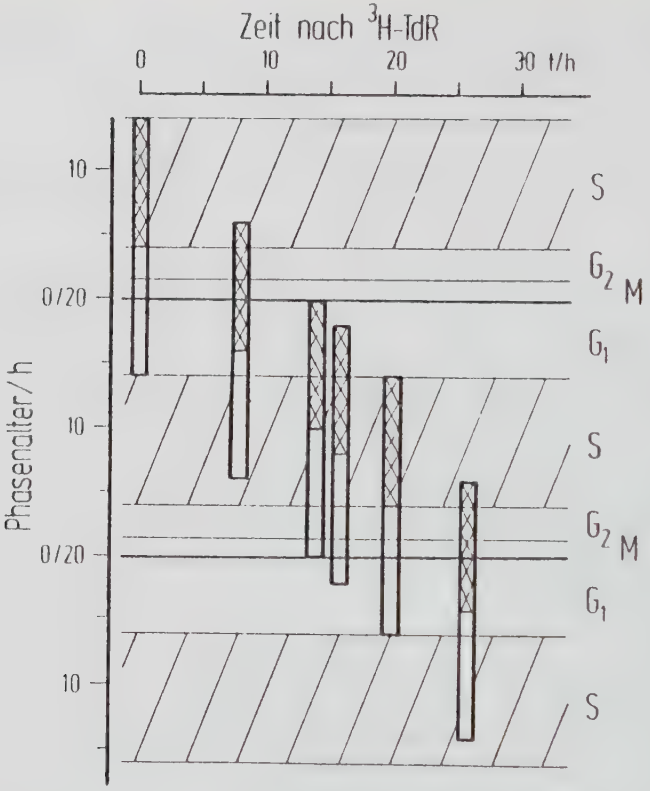

Abb. 9: Phasenalter markierter (schraffierte Rechtecke) und unmarkierter proliferierender Gliazellen (Rechtecke ohne Schraffierung) als Funktion der Zeit nach Injektion von ^{3}H-TdR

Zur Aufstellung des Phasendiagramms siehe Text.

kierten Zellen (schraffiertes Rechteck in Abb. 9) alle in der auf die Markierung folgenden S-Phase befinden. Die bei t = 0 h unmarkiert gebliebenen proliferierenden Zellen (Rechteck ohne Schraffierung) liegen in G_2, M oder G_1. Man sollte also bei t = 20 h nur unmarkierte Gliamitosen finden - vorausgesetzt, die dem Phasendiagramm zugrunde liegenden Zykluszeiten sind richtig und weisen auch keine größeren Schwankungen auf. Markierte Mitosen wären erst wieder ab t > 23 h zu erwarten. Wie aus Abb. 2 hervorgeht, fanden sich jedoch (bei den hier gewählten langen Belichtungszeiten) bereits für t = 20 h ca. 100 % markierte Mitosen. Eine genaue Analyse der Kornzahl dieser Mitosen (Tab. 4) macht deutlich, daß fast alle der hier als markiert registrierten Mitosen nur schwach markiert waren, also zur Gruppe der durch Wiederverwendung markierten Gliazellen gehören. Das heißt, daß das für t = 20 h aus Abb. 2 entnommene zweite Maximum der PLM-Kurve nicht zu den initial markierten Zellen gehört. Das für eine Bestimmung der Generationszeit mit der PLM-Methode gesuchte zweite Maximum der initial markierten Zellen ist wegen des Auftretens schwach markierter Mitosen hier nicht zu erkennen; es dürfte zu einem späteren Zeitpunkt liegen. Auf Grund der aus den Untersuchungen von Schilling (1978) und Dauenhauer (1980) bekannten Werte ist es ca. 28 h nach der ^{3}H-TdR Injektion zu erwarten. Außerdem ist zu berücksichtigen, daß dieses zweite Maximum - wegen des Vorhandenseins von Schwankungen in der Dauer der einzelnen Zyklusphasen - nicht mehr so deutlich ausfallen wird wie das erste Maximum; es wird sicherlich bei wesentlich kleineren PLM-Werten als 100 % liegen. Damit wird insgesamt klar, daß die hier bestimmte Zeitspanne T_C = 12 - 13 h falsch ist, d.h. T_C wird sicherlich größer sein.

Zum Verlauf der PLM-Kurve zwischen t = 14 h und t = 20 h ist weiterhin noch anzumerken, daß sich dieser Anstieg zu einem zweiten Maximum möglicherweise durch das mit fortschreitender Zeit vermehrte Auftreten schwach markierter Mitosen erklären läßt. Wenn auch für dieses Zeitintervall nur bei drei Versuchstieren jeweils 13 - 36 markierte Mitosen näher analysiert wurden (Tab. 4), so deuten die wenigen Daten doch bereits auf

diese Erklärungsmöglichkeit hin. Außerdem sollte man berücksichtigen, daß erst für die Autoradiogramme ab t = 18 h die Belichtungszeiten verlängert wurden (siehe Tab. 1, Spalte III). Das bedeutet, daß für die Versuchszeiten t = 12 h bis t = 16 h nur jeweils ein Teil der vorhandenen schwach markierten Mitosen auch tatsächlich erfaßt wurde.

Wenn das zweite Maximum der initial markierten Zellen demnach verdeckt ist, stellt sich die Frage, ob es sich nicht nach Aussondern der schwach markierten Mitosen erhalten läßt. Ein derartiges Verfahren wurde z.B. von Schultze et al. (1973) bei PLM-Untersuchungen an der regenerierenden Mäuseleber angewendet: Da sich diese Autoren allein auf das Registrieren von Metaphasen mit in etwa gleich großen Anschnittsflächen beschränkt hatten, ließ sich hier die Gruppe der schwach markierten Mitosen eindeutig abtrennen, so daß schließlich eine PLM-Kurve für die initial markierten Zellen konstruiert werden konnte.

Dieses Verfahren ließ sich allerdings hier nicht anwenden, da - wie bereits in Kap. III.3.2. erwähnt - nur ein nicht genau angebbarer Teil der stark markierten Mitosen registriert wurde. Ein alleiniges Registrieren von Mitosen eines einzigen Stadiums, z.B. von Metaphasen, die außerdem noch eine einheitliche Anschnittsfläche aufweisen, ist im Gehirn der 14 Tage alten Ratte aus praktischen Gründen nicht durchzuführen: Bei einem auf Grund der schon bekannten Zellzyklusparameter abschätzbaren Glia-Mitoseindex, d.h. Verhältnis von Anzahl Mitosen aller Stadien zu Anzahl aller Zellen eines Zelltyps (hier Gliazellen), von ca. 0,18 % (Cortex) bzw. 0,54 % (Corpus callosum) wäre der Zeitaufwand unvertretbar hoch. Damit wird insgesamt klar, daß sich die PLM-Methode für Untersuchungen am Gehirn junger Tiere wenig eignet: Zwar ist es durchaus möglich, die Dauer der Phasen G_2 + M und evtl. noch von S zu bestimmen; bei längeren Versuchszeiten - wie sie zur Bestimmung der Generationszeit notwendig sind - wird aber wegen des Auftretens von durch Wiederverwendung markierten Mitosen eine genaue Bestimmung praktisch unmöglich.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1) Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit autoradiographischen Untersuchungen zur Proliferation von Glia- und Endothelzellen in Cortex und Corpus callosum der 14 Tage alten Ratte. Die Zellzyklusparameter dieser Zellen sollten mit Hilfe der Prozent-markierte-Mitosen-Methode (PLM-Methode) nach Injektion von ^{3}H-TdR bestimmt werden. Da früher bereits Untersuchungen zum Zellzyklus dieser Zellen mit anderen, zum Teil neuartigen Methoden durchgeführt worden waren, wurde ein Vergleich der unterschiedlichen zellkinetischen Methoden angestrebt.

2) Die Auswertung der Untersuchungen erfolgte an Autoradiogrammen von 3 µm dicken Paraffinschnitten nach einer Feulgen-Färbung. Dabei ließen sich Mitosen von Gliazellen nicht in allen Fällen von Endothelzell-Mitosen unterscheiden; für die PLM-Kurve wurden deshalb beide Zellarten zusammengefaßt. Um auch kleine Anschnitte von Mitosen mit geringer Kornzahl sicher vom Nulleffekt unterscheiden zu können, wurde die Belichtungszeit der Autoradiogramme mit fortschreitender Versuchszeit verlängert.

3) Die PLM-Kurve beruht auf der Auswertung von ca. 100 Mitosen pro Tier an 64 untersuchten Versuchstieren für das Zeitintervall 1 h - 44 h nach Injektion von ^{3}H-TdR. Aus dem Verlauf dieser Kurve ergaben sich folgende Zykluszeiten: $T_C \sim 12\,h - 13\,h$; $T_S \sim 10\,h$; $T_{G_2} + 1/2\,M \sim 3\,h$; $T_{G_1} \sim 0\,h$.

4) Aus einem Vergleich der hier erhaltenen Zykluszeiten mit denjenigen für Glia- und Endothelzellen in Cortex und Corpus callosum gleichaltriger Ratten, die mit Hilfe anderer Methoden erhalten worden waren, ergab sich eine gute Übereinstimmung im Hinblick auf die Dauer der S-Phase. Bei der Dauer der Generationszeit bestand jedoch eine auffallende Diskrepanz: Die in der vorliegenden Arbeit gemessene Zeitspanne $T_C \sim 12\,h - 13\,h$ ist wesentlich kürzer als die Zyklusdauer von ca. 20 h, die über-

einstimmend aus speziellen Doppelmarkierungsversuchen mit ^{3}H- und ^{14}C-TdR sowie aus dem Abfall der mittleren Kornzahl pro Kern als Funktion der Zeit nach Injektion von ^{3}H-TdR erhalten worden war.

5) Eine Diskrepanz war auch offenkundig, wenn man die hier bestimmte Zykluszeit mit Literaturwerten für verschiedene Zellarten im Gehirn von Nagern während der prä- und postnatalen Ontogenese verglich: Werte für T_C um 12 h kamen nur pränatal vor, keinesfalls aber mehr postnatal.

6) Zur Klärung des aufgetretenen Widerspruchs wurde zunächst die Frage überprüft, ob es nach Injektion von ^{3}H-TdR für Zellen des Gehirns auch tatsächlich zu einer Pulsmarkierung kommt. Das Vorliegen einer Pulsmarkierung ist eine wesentliche Voraussetzung zur Anwendbarkeit der PLM-Methode. Dazu wurde die maximale Verfügbarkeitszeit für Glia- und Endothelzellen gemessen, d.h. diejenige Zeitspanne, in der nach der initialen ^{3}H-TdR Injektion noch fixierbare ^{3}H-DNA gebildet wird. Aus dem Anstieg der mittleren Kornzahl pro Kern als Funktion der Zeit nach Injektion von ^{3}H-TdR ergab sich diese Zeitspanne mit maximal 120 min, jedoch betrug der Zuwachs an neu synthetisierter markierter DNA zwischen 60 und 120 min nur noch ca. 10 % des Maximalwerts. Es ließ sich zeigen, daß auf Grund der hier erstmals für Zellen des Gehirns bestimmten Verfügbarkeitszeit die vorliegende Diskrepanz nicht zu erklären war.

7) Weiterhin wurde untersucht, ob die aufgefundene Diskrepanz evtl. auf eine Markierung proliferierender Zellen durch Wiederverwendung ^{3}H-markierter DNA-Metabolite zurückzuführen ist. Diese Möglichkeit wurde zunächst nicht in Betracht gezogen, da von der Existenz einer Blut-Hirn-Schranke (BHS) gegenüber TdR ausgegangen wurde. Dabei wurde allerdings vorausgesetzt, daß die Ergebnisse bei der adulten Maus auch für die 14 Tage alte Ratte zutreffen, d.h. daß zur Markierung einer Glia- oder Endothelzelle im Gehirn der 14 Tage alten Ratte genauso wie bei der adulten Maus etwa 10 mal mehr ^{3}H-TdR notwendig ist als zur gleichstarken Markierung einer Körperzelle.

Diese Voraussetzung wurde zunächst experimentell überprüft. Ein Vergleich der Korndichten zwischen Gliazellen und Kryptenepithelzellen aus dem Jejunum erbrachte das überraschende Ergebnis, daß die Korndichte bei beiden Zellarten entgegen aller Vermutung annähernd gleich war, es also keinen Unterschied um den Faktor 10 wie bei der adulten Maus gab. Eine BMS gegenüber TdR liegt also für Zellen im Gehirn der 14 Tage alten Ratte nicht vor.

8) Nachdem sich die Annahme einer BMS für die hier untersuchten Tiere als falsch erwiesen hatte, wurde die Möglichkeit einer Markierung durch Wiederverwendung von ^{3}H-DNA-Metaboliten näher untersucht. Auf Grund einer genauen Analyse von Korndichten bei Interphasezellen und Mitosen konnte in der Tat nachgewiesen werden, daß die PLM-Kurve nicht aus initial markierten, sondern auch aus Zellen besteht, die zu einem späteren Zeitpunkt markiert wurden. Ein Literaturvergleich machte deutlich, daß diese später markierten Zellen wahrscheinlich auf Grund einer Wiederverwendung von ^{3}H-DNA-Metaboliten markiert worden sind.

9) An Hand eines Phasendiagramms für proliferierende Gliazellen konnte gezeigt werden, daß bei einer Bestimmung von T_C mit Hilfe der PLM-Methode zu kurze Zeitspannen gemessen werden, wenn neben den initial markierten auch noch zu späteren Zeitpunkten markierte Zellen registriert werden.

10) Die vorliegenden Untersuchungen haben insgesamt gezeigt, daß die PLM-Methode für Zellen des Gehirns, wo viele kleine, nur schwach markierte Mitoseanschnitte vorkommen (die man andererseits auch nicht vernachlässigen kann) wenig geeignet ist. Der Weg, über eine Verlängerung der autoradiographischen Belichtungszeit zu besseren Auswertungsbedingungen zu kommen, hat sich wegen der Existenz einer Markierung durch Wiederverwendung als nicht gangbar erwiesen. Andererseits spielt der Faktor "Markierung durch Wiederverwendung" bei zellkinetischen Untersuchungen mit Doppelmarkierungsmethoden oder bei der "grain-count halving method" keine Rolle, da hier nur kurze Belichtungszeiten gebraucht werden, bei denen

eine schwache Markierung durch Wiederverwendung stets unterhalb der Nachweisgrenze bleibt. Damit dürften die beiden letztgenannten Methoden für Untersuchungen am Gehirn junger Tiere besser geeignet sein als die sonst übliche PLM-Methode.

An dieser Stelle möchte ich Herrn em. Professor Dr. W. Maurer und Herrn Professor Dr. A.M. Kellerer für die Arbeitsmöglichkeit an ihrem Institut und für ihre Diskussionsbereitschaft danken.

Besonders danke ich Frau Professor Dr. B. Maurer-Schultze für die Überlassung des Themas und für ihre Hilfestellung bei Planung und Diskussion der Versuche.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr.habil. H. Korr für seinen Rat und seine ständige Unterstützung sowohl bei Planung und Ausführung der Versuche als auch bei allen Problemen, die sich bei der Herstellung der vorliegenden Arbeit ergaben.

Nicht zuletzt möchte ich allen technischen Assistentinnen der Abteilung, die für die mühevolle Herstellung der vielen Autoradiogramme verantwortlich waren, meinen Dank aussprechen.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

AHERNE, W.A., R.S. CAMPLEJOHN and N.A. WRIGHT: An introduction to cell population kinetics.
Edward Arnold Ltd, London 1977

AMLACHER, E.: Autoradiographie in Histologie und Zytologie.
VEB Georg Thieme, Leipzig 1974

BRIÈRE, N. and H. ISLER: Deoxyribonucleic acid labelling after tritiated thymidine injection.
Canad. J. Physiol. Pharmacol. 44, 451-453 (1966)

CARLSSON, J., K.J. JOHANSON and J.O. SÄFWENBERG: Age dependent changes in the metabolism of ^{3}H-thymidine and ^{3}H-uridine in young rats.
Growth 43, 105-115 (1979)

CAVANAGH, J.B. and P.D. LEWIS: Perfusion-fixation, colchicine and mitotic activity in the adult rat brain.
J. Anat. 104, 341-350 (1969)

CHANG, L.O. and W.B. LOONEY: A biochemical and autoradiographic study of the in vivo utilization of tritiated thymidine in regenerating rat liver.
Cancer Res. 25, 1817-1822 (1965)

CLEAVER, J.E.: Thymidine metabolism and cell kinetics. In: Frontiers of biology, vol. 6 (A. NEUBERGER and E.L. TATUM, eds.), North-Holland Publ. Comp., Amsterdam 1967

DAUENHAUER, M.: Autoradiographische Untersuchungen zur Proliferation von Glia- und Endothelzellen im Neocortex und Corpus callosum junger Ratten. Dissertation Med. Fachbereich Würzburg 1980 (in Vorber.)

FEINENDEGEN, L.E.: Tritium labelled molecules in biology and medicine.
Academic Press: New York and London 1967

FLEISCHHAUER, K.: Postnatale Entwicklung der Neuroglia.
Zentralbl. Neurol. Psychiatrie 188, 385-386 (1967)

GERECKE, D.: An improved method for the evaluation of DNA synthesis time from the graph of labelled mitoses.
Exp. Cell Res. 62, 487-489 (1970)

KAPPELER, G.W.: Autoradiographische Untersuchungen zur Bestimmung der Verfügbarkeitszeit von ^{3}H- und ^{14}C-Thymidin in den Jejunumkrypten der Maus. Dissertation Med. Fachbereich Würzburg 1979

KNORRE, J.: Autoradiographische Untersuchungen zur Proliferation von Endothelzellen im Gehirn der adulten Maus. Dissertation Med. Fachbereich Würzburg 1979

KOBURG, E. und W. MAURER: Autoradiographische Untersuchungen mit ^{3}H-Thymidin über die Dauer der Deoxyribonukleinsäure-Synthese und ihren zeitlichen Verlauf bei den Darmepithelien und anderen Zelltypen der Maus. Biochem. Biophys. Acta 61, 229-242 (1962)

KORR, H., B. SCHULTZE and W. MAURER: Autoradiographic investigations of glial proliferation in the brain of adult mice. I. The DNA synthesis phase of neuroglia and endothelial cells. J. Comp. Neur. 150, 169-176 (1973)

KORR, H., B. SCHULTZE and W. MAURER: Autoradiographic investigations of glial proliferation in the brain of adult mice. II. Cycle time and mode of proliferation of neuroglia and endothelial cells. J. Comp. Neur. 160, 477-490 (1975)

KORR, H.: Autoradiographische Untersuchungen zur Proliferation verschiedener Zellelemente im Gehirn von Nagern während der prä- und postnatalen Ontogenese. Habilitationsschrift, Universität Würzburg 1978

KORR, H.: Proliferation of different cell types in the brain. Advances Anat. Embryol. Cell Biol., vol. 61, Springer: Berlin, Heidelberg, New York 1980

KRAUS-RUPPERT, R.J. LAISSUE, H. BÜRKI and N. ODARTCHENKO: Kinetic studies on glial, Schwann and capsular cells labelled with ^{3}H-thymidine in cerebrospinal tissue of young mice. J. neurolog. Sci. 26, 555-563 (1975)

LANG, W. und W. MAURER: Zur Verwendbarkeit von Feulgen-gefärbten Schnitten für quantitative Autoradiographie mit markiertem Thymidin. Exp. Cell Res. 39, 1-9 (1965)

LING, E.A., J.A. PATERSON, A. PRIVAT, S. MORI and C.P. LEBLOND: Investigation of glial cells in semithin sections. I. Identification of glial cells in the brain of young rats. J. Comp. Neur. 149, 43-72 (1973)

MARES, V. and Z. LODIN: DNA synthesis in glial cells of the mouse brain at late periods of ontogenetic development. Physiol. bohemoslov. 21, 97-98 (1972)

MORI, S. and C.P. LEBLOND: Identification of microglia in light and electron microscopy. J. Comp. Neur. 135, 57-80 (1969a)

MORI, S. and C.P. LEBLOND: Electron microscopic features and proliferation of astrocytes in the corpus callosum of the rat.
J. Comp. Neur. 137, 197-226 (1969b)

MORI, S. and C.P. LEBLOND: Electron microscopic identification of three classes of oligodendrocytes and a preliminary study of their proliferative activity in the corpus callosum of young rats.
J. Comp. Neur. 139, 1-30 (1970)

NOWAKOWSKI, R.S. and P. RAKIC: Clearence rate of exogenous ^{3}H-thymidine from the plasma of pregnant Rhesus monkeys.
Cell Tissue Kinet. 7, 189-194 (1974)

OLSSON, Y. and I. KLATZO: Blood-brain barrier to albumin in embryonic new born and adult rats.
Acta neuropath. (Berl.) 10, 117-122 (1968)

PELC, S.R. and T.C. APPLETON: Distribution of tritiated thymidine in various tissues.
Nature (London) 205, 1287-1289 (1965)

PENFIELD, W.: Neuroglia: Normal and pathological. In: Cytology & cellular pathology of the nervous system, vol. 2 (W. Penfield, ed.).
Paul B. Hoeber Inc.: New York 1932

QUASTLER, H. and F.G. SHERMAN: Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse.
Exp. Cell Res. 17, 420-438 (1959)

SCHILLING, W.-D.: Autoradiographische Untersuchungen zur Proliferation von Glia- und Endothelzellen in verschiedenen Hirnregionen der jungen Ratte. Dissertation Med. Fachbereich, Würzburg 1978

SCHULTZE, B.: Die Orthologie und Pathologie des Nucleinsäure- und Eiweißstoffwechsels der Zelle im Autoradiogramm. In: Handbuch der allgemeinen Pathologie (H.W. ALTMANN, F. BÜCHNER, H. COTTIER, G. HOLLE, E. LETTERER, W. MASSHOFF, H. MEESSEN, F. ROULET, G. SEIFERT, G. SIEBERT und A. STUDER, Hrsg.), Bd. II/5, Springer Verlag; Berlin, Heidelberg, New York 1968, p. 466-670

SCHULTZE, B.: Autoradiography at the cellular level. In: Physical Techniques in Biological Res. 2nd ed., vol. III b (A.W.POLLISTER, ed.), Academic Press:
New York and London 1969

SCHULTZE, B., H. GERHARD, E. SCHUMP und W. MAURER: Autoradiographische Untersuchung über die Proliferation der Hepatocyten bei der Regeneration der CCl_4-Leber der Maus.
Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 14, 329-343 (1973)

SCHULTZE, B., N. HÖRNING und W. MAURER: Blut-Hirn-Schranke und Plazentar-Schranke für ^{3}H-Thymidin und ^{3}H-Cytidin bei der Maus. (Untersuchungen mit Ganzkörper-Autoradiographie.) Z. Naturforsch. 27b, 554-558 (1972)

SHIMODA, A.: An electron microscope study of the developing rat brain, concerned with the morphological basis of the blood-brain barrier.
Acta path. Japonica 13, 95-105 (1963)

SKOUGAARD, M.R. and P.A. STEWARD: Comparative effectiveness of intraperitoneal and intramuscular ^{3}H-thymidine injection routes in mice.
Exp. Cell Res. 45, 158-166 (1966)

SMART, I. and C.P. LEBLOND: Evidence for division and transformations of neuroglia cells in the mouse brain, as derived from radioautography after injection of thymidine-H-3.
J. Comp. Neur. 116, 349-367 (1961)

STÖCKER, E. und U. PFEIFER: Autoradiographische Untersuchungen mit ^{3}H-Thymidin an der regenerierenden Rattenleber.
Z. Zellforsch. 79, 374-388 (1967)

L e b e n s l a u f

Am 26.9.1953 wurde ich, Barbara Ernestine Wittmann, als zweites Kind des Regierungsamtmannes Michael Wittmann und seiner Ehefrau Anna Wittmann, geb. Billert, in Neustadt/Aisch geboren.

Dort besuchte ich von 1959 bis 1963 die Volksschule und anschließend das altsprachliche Friedrich-Alexander-Gymnasium, an dem ich 1972 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1972/73 immatrikulierte ich mich an der Universität Würzburg für das Fach Humanmedizin. Im März 1975 bestand ich das Physikum, im März 1976 legte ich den ersten Teil, im März 1978 den zweiten Teil des Staatsexamens ab.

Im folgenden prakt.-klinischen Jahr war ich von Mitte Oktober 1978 bis Anfang Februar 1979 im Fach Innere Medizin am Lehrkrankenhaus Juliusspital Würzburg, darauf bis Ende Mai 1979 in meinem Wahlfach Psychiatrie an der psychiatrischen Universitätsklinik Würzburg und schließlich von Anfang Juni 1979 bis Mitte September 1979 im Fach Chirurgie an der chirurgischen Universitätsklinik Würzburg tätig.

Am 15. Oktober 1979 bestand ich den schriftlichen Teil, am 26. Oktober 1979 den mündlichen Teil des dritten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung.

Am 2. November 1979 erhielt ich meine Approbation als Ärztin.

Würzburg, den 12. Juni 1980

Barbara Wittmann